



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACIÓN DE CULTIVOS  
IN VITRO DE PAPA (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)  
LIBRES DE VIRUS**

**TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QFB BIOQUÍMICO-MICROBIOLÓGICA**

**PRESENTA  
ALEJANDRA LÓPEZ CARRILLO**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. JORGE RAFAEL MARTÍNEZ PENICHE**

**VOCAL: DR. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ**

**SECRETARIO: M. EN C. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES**

**1er. SUPLENTE: DR. VICTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA**

**2° SUPLENTE: DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA EDIFICIO "E", CIUDAD UNIVERSITARIA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M. EN C. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES**

**SUSTENTANTE:**

**ALEJANDRA LÓPEZ CARRILLO**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a la M. en C. Teresa de Jesús Olivera por su paciencia, motivación y enseñanzas durante la dirección de esta tesis, pero sobretodo, gracias por tu amistad Mayte.

También deseo agradecer al Dr. Javier Plasencia por su valiosa dirección en la determinación de los virus estudiados y por sus atinadas aportaciones, así como a la M. en C. Diana Sánchez Rangel por el apoyo técnico en la implementación e interpretación de resultados de la técnica de ELISA.

A la Dra. Josefina Herrera, al Dr. Víctor Chávez y al Dr. Elpidio García, gracias por su apoyo y sus consejos para mejorar este trabajo.

Agradezco también a mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por su ayuda y compañía.

Por último, agradezco a mi madre, a mis hermanos, a mis hijos y sobre todo a José Manuel Valverde, cuya confianza constituyó el estímulo necesario para concluir esta etapa.

## CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
I. LA PAPA, GENERALIDADES	2
Producción y consumo de papa en México	2
Origen y difusión de la papa	3
Contenido nutricional	4
Usos	4
Clasificación taxonómica	5
Características de la planta de papa	6
El tubérculo	7
El cultivo de papa	9
Factores que afectan el cultivo de papa	10
Principales patógenos del cultivo de papa	11
II. ENFERMEDADES VIRALES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE PAPA	13
Mecanismos de transmisión de los virus	13
Virus de la papa de importancia económica	16
Control de enfermedades virales	18
Detección de virus por técnicas serológicas, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	19
III. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	22
Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	22
Cultivo de tejidos vegetales en la propagación de plantas	25
IV. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE PAPA LIBRES DE VIRUS	29
Micropropagación de papa	29

Eliminación de virus	31
A. Cultivo de meristemos	32
B. Termoterapia	34
C. Quimioterapia	34
Producción de microtubérculos	35
OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Lugar de ejecución	39
Material biológico	39
Aspectos generales	41
Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.), variedad Fiannas	43
Proliferación y mantenimiento de plántulas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.), variedad Fiannas	46
Detección de los virus PVA, PVS, PVY y PVX en plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero y en plántulas <i>in vitro</i> mediante técnica de ELISA	47
Eliminación de virus	50
Producción de microtubérculos	50
RESULTADOS	52
Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de plantas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.), variedad Fiannas	52
Inducción, proliferación y mantenimiento de plántulas de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> L.), variedad Fiannas	54
Detección de los virus PVA, PVS, PVY y PVX en plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero y en plántulas <i>in vitro</i> mediante técnica de ELISA	57
Eliminación de virus mediante termoterapia y quimioterapia	61
Producción de microtubérculos	62
ANÁLISIS DE RESULTADOS	65
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Anatomía de la planta de papa	7
2	Tubérculo de papa	8
3	Pasos involucrados en la técnica de ELISA	21
4	Ruta crítica para la obtención de plantas de papa libres de virus	38
5	Tubérculos-semilla de papa, variedad Fiannas	39
6	Fuentes de explantes empleadas	43
7	Distribución de blancos y controles en la microplaca de ELISA	48
8	Plantas de papa desarrolladas en condiciones de invernadero	53
9	Cronograma del esquema de micropropagación	56
10	Inducción y proliferación de plántulas de papa, variedad Fiannas	57
11	Microplaca de ELISA mostrando resultados positivos (pozos amarillos) y negativos (pozos transparentes)	58
12	Tuberización <i>in vitro</i> de plántulas de papa	64

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Virus de la papa, modo de transmisión, síntomas y pérdida potencial de rendimiento del cultivo	16
2	Ejemplos de especies liberadas de virus mediante técnicas <i>in vitro</i>	32
3	Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados	42
4	Tratamientos de desinfección probados para el establecimiento de cultivos de yemas de papa, variedad Fiannas	45
5	Composición de los medios de cultivo empleados en el ensayo de inducción de tuberización	51
6	Resultados de cultivos de yemas establecidos, después de someterse a los diferentes tratamientos de desinfección	53
7	Resultados de la inducción de yemas y la proliferación de nudos de planta de papa	55
8	Resultados de las pruebas de ELISA realizadas a plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero y a plántulas <i>in vitro</i> procedentes de tubérculos-semilla del Grupo A	59
9	Resultados de las pruebas de ELISA realizadas a las plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero obtenidas de tubérculos-semilla del Grupo A y Grupo B	60
10	Resultados del ensayo de inducción de tuberización	62



## RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cultivo más importante a nivel mundial, después del maíz, el trigo y el arroz. Su alto valor nutritivo lo hace un alimento determinante para garantizar la seguridad alimentaria, además de poseer múltiples usos como materia prima en la industria.

El hecho de que la papa se propague vegetativamente a través de su tubérculo, la hace susceptible a diferentes patógenos. Los virus, PVX, PVY, PVA, PVS y PLRV, se perpetúan sistémicamente a través de los tubérculos causando la degradación gradual de las variedades, lo cual afecta el rendimiento y la calidad de la producción.

Este trabajo propone una ruta para la obtención de una población de plántulas de papa en condiciones *in vitro*, partiendo de tubérculos-semilla variedad Fiannas. Para ello se indujo crecimiento a yemas axilares de plantas de papa crecidas en invernadero, empleando un medio de cultivo con sales MS, ácido giberélico ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sacarosa ( $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Mediante subcultivos periódicos de segmentos uninodales del material vegetal establecido, se consiguió la multiplicación masiva de plantas, obteniendo al cabo de veintiséis semanas cerca de 1,000 individuos con una tasa de multiplicación de ocho brotes por explante.

Mediante la aplicación de termoterapia a  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante tres semanas y quimioterapia con Ribavirina ( $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), se detectó tanto en las plántulas *in vitro* como *ex vitro*, una disminución en el porcentaje de los virus infectantes. Esto pudo comprobarse mediante la determinación de los virus X, Y, S y A de papa, por DAS-ELISA antes y después de aplicar ambas terapias para la eliminación de virus.

Se alcanzó la tuberización *in vitro* partiendo de plantas libres de PVS, utilizando un medio de cultivo con sales MS, sacarosa ( $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), BA ( $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y una alta concentración de gelificante ( $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ); obteniéndose microtubérculos de entre 50 y 400 mg de peso fresco.

Se mantuvo una colección de propágulos limitando su crecimiento, en medio con sales MS adicionado con sacarosa ( $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sorbitol ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y agargel ( $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

## ANTECEDENTES

### I. LA PAPA, GENERALIDADES

La papa *Solanum tuberosum* L., es una herbácea anual de la familia Solanaceae que produce un tubérculo, la papa misma. Debido a su capacidad de reproducción vegetativa mediante este tubérculo, puede comportarse potencialmente como una especie perenne.

Ocupa un lugar importante en la agricultura, economía y seguridad alimentaria, en la actualidad constituye el cuarto lugar de los cultivos que sustentan la nutrición a nivel mundial, después del maíz, el trigo y el arroz, con una superficie cosechada reportada para el año 2009 de 18,651,838 hectáreas y una producción de 329,581,307 toneladas (FAOSTAT, 2009).

#### **Producción y consumo de papa en México**

El cultivo de papa tiene en México gran importancia económica, ya que es de los pocos cultivos que se desarrolla en casi todo el territorio nacional. Actualmente se cultiva en veintidós estados de la República, pero la mayor parte de la producción (72%) se concentra en seis estados. Se cultiva tanto en el ciclo otoño-invierno como en el primavera-verano; tanto en la modalidad de riego como en la de temporal.

En 2009, la superficie sembrada de papa en el país fue de 54 mil hectáreas, siendo los estados de Sinaloa, Sonora, Estado de México, Veracruz, Puebla, Nuevo León y Chihuahua, en orden de importancia, los de mayor superficie ocupada por este cultivo. De ella, se obtuvo una producción de 1 millón 500 mil toneladas ([www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx)).

Los rendimientos de este cultivo son muy dispares entre los diferentes estados. En 2009, el rendimiento promedio en el país fue de 27.74 t/ha; entre los principales estados productores Nuevo León obtuvo el más alto rendimiento con 37.4 t/ha, como consecuencia de la implementación de nuevas tecnologías agrícolas y de la utilización de semilla certificada (CONPAPA, 2011). Sin embargo, el rendimiento promedio nacional de este cultivo supera al rendimiento mundial, que en ese mismo año fue de 17.98 t/ha.

A pesar de que la papa se produce casi todo el año y de su gran valor alimenticio, el consumo anual en nuestro país es muy bajo, en 2009 apenas alcanzó 17.2 kg/habitante, mientras que el consumo promedio anual de este tubérculo en el mundo es de 31.3 kg/habitante (www.siap.sagarpa.gob.mx; FAO STAT, 2008).

### **Origen y difusión de la papa**

La papa es una hortaliza originaria de América. Las evidencias han mostrado que la zona con mayor diversidad genética de papa cultivada, se encuentra entre la cordillera blanca de los Andes centrales de Perú y las vecindades del lago Titicaca, al noroeste de Bolivia, en donde podría encontrarse el punto de origen de su domesticación. Esta zona de las altiplanicies andinas, ubicada entre los 3,000 y 4,000 metros de altitud, es el único sitio en el que se pueden apreciar las nueve especies cultivadas reconocidas de este tubérculo. Sin embargo, la diversidad biológica no se limita a las especies cultivadas, existe un complejo grupo de especies silvestres no comestibles (alrededor de 220) distribuidas en estado natural en una amplia zona que va desde la región suroeste de los Estados Unidos (Nebraska y Colorado) hasta Chile (Luján-Claire, 1996).

Antes que la papa, llegó a España la batata o camote proveniente de las Antillas o México, es por ello que a la llegada de la papa, entre los años 1565 y 1570 y por tratarse de una planta que también producía tubérculos subterráneos, le llamaron "patata". De España la papa pasó al resto del continente, a Inglaterra llegó en 1590. Entre los primeros en apreciar la papa como alimento estuvieron los marineros, que se proveían de tubérculos para consumirlos durante sus largas travesías, fue así como la papa llegó a la India, China y Japón a principios del siglo XVII. La papa también recibió gran acogida en Irlanda, donde resultó adecuada para el clima fresco y el suelo húmedo. Los emigrantes irlandeses se llevaron este tubérculo a América del Norte a principios del siglo XVIII. Más tarde (1845-1847), cuando la papa ya era reconocida como cultivo que proporcionaba seguridad alimentaria, ocurrió una destrucción masiva de los cultivos europeos, principalmente de Irlanda, a causa del oomiceto *Phytophthora infestans*, provocando una hambruna que

mató a un millón de personas. Esta catástrofe motivó la búsqueda de variedades más productivas y resistentes a las enfermedades, produciéndose en Europa y América del Norte muchas de las modernas variedades que sentaron las bases de la enorme producción de papa en ambas regiones durante la mayor parte del siglo XX, difundidas a todo el mundo gracias al colonialismo y la emigración europea (FAO, 2008; Luján-Claure, 1996).

### **Contenido nutricional**

La papa posee un gran contenido de carbohidratos. Recién cosechada, contiene un 75% de agua y un 25% de materia seca, de la cual cerca del 80% está constituida por almidón. El contenido de proteína de la papa es análogo al de los cereales, el cual es muy alto en comparación con otras raíces y tubérculos.

Las papas contienen abundantes micronutrientes, especialmente vitamina C; una papa de 150 gramos, consumida con piel, aporta casi la mitad de las necesidades diarias del adulto (100 mg). La papa contiene una cantidad moderada de hierro, pero su gran contenido de vitamina C fomenta la absorción de este mineral. Además, este tubérculo tiene vitaminas B1, B2 y B3, y minerales como potasio, fósforo, calcio y magnesio. También contiene antioxidantes, fibra y muy poca grasa; todo esto lo convierte en un alimento muy saludable (FAO, 2008).

### **Usos**

Uno de los primeros usos que se le dio a la papa fue como alimento para el ganado. En la actualidad se destina principalmente a la alimentación humana como producto fresco. Sin embargo, su consumo como alimento procesado, ya sea frita, congelada, en puré, deshidratada o en hojuelas, ha ido adquiriendo cada vez más importancia.

La industria alimentaria utiliza la harina de papa, que no contiene gluten pero sí abundante almidón, para aglutinar productos compuestos de diversos tipos de carnes, harinas para pastel, masas, galletas y helado, así como para impartir espesor a salsas y sopas. En Europa oriental y en los países escandinavos, las papas molidas se someten a tratamiento térmico para

convertir su almidón en azúcares que se fermentan y destilan para producir bebidas alcohólicas, como el vodka y aguardientes típicos de esas regiones (FAO, 2008).

El almidón de la papa también es ampliamente utilizado por las industrias farmacéutica, textil, de la madera y del papel, como adhesivo, aglutinante, texturizador y relleno, es un sustituto 100% biodegradable del poliestireno y se utiliza, entre otras cosas, para hacer platos y cubiertos desechables. La cáscara de la papa y otros desechos se pueden licuar para obtener etanol apto para la producción de combustibles.

En la industria minera y petrolera el almidón también desempeña una función importante como agente floculante, en las minas de potasio, en la recuperación de vanadio, en la metalurgia del plomo y del cobre y en las perforaciones petrolíferas.

Por último, ya que el cultivo de papa se multiplica principalmente en forma vegetativa, es decir, a partir del tubérculo mismo, una parte importante de la cosecha anual (entre el 5 y el 15%) se destina como semilla, incluso existen proveedores especializados de "semillas certificadas" libres de enfermedades (Montaldo, 1984).

### **Clasificación taxonómica**

La papa pertenece a la familia de las solanáceas, del género *Solanum*, formado por otras mil especies por lo menos, como el tomate y la berenjena. *S. tuberosum* se divide en dos subespecies apenas diferentes: la *andigena*, adaptada a condiciones de días breves, cultivada principalmente en los Andes, y *tuberosum*, la que actualmente se cultiva en todo el mundo y se piensa que descende de una pequeña introducción en Europa de papas *andigena*, posteriormente adaptadas a días más prolongados (FAO 2008; Rousselle *et al.*, 1996).

De acuerdo con la clasificación propuesta por Linneo (1753), la clasificación taxonómica de la papa es:

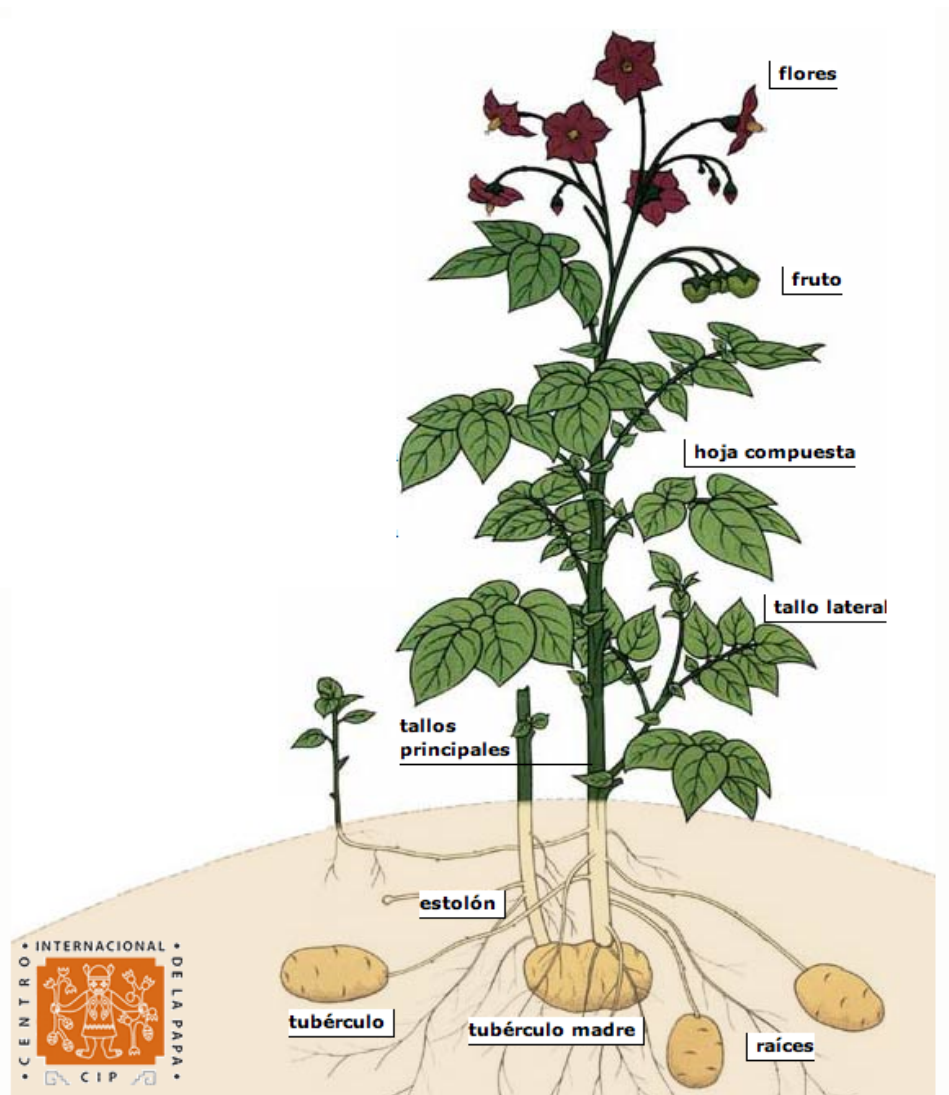
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i>
Especie:	<b><i>S. tuberosum</i></b>

### **Características de la planta de papa**

La papa (*Solanum tuberosum* L.), es una planta dicotiledónea cuyo sistema radical es de origen adventicio, en verticilo, con raíces fibrosas, ramificadas extendidas y superficiales, que se concentran en un radio de 50 cm del eje central.

El sistema caulinar está representado por uno o más tallos erectos que se originan en las yemas del tubérculo-semilla; estos tallos son suculentos, más o menos angulares, con ramificaciones y una altura variable entre 0.5 a 1.0 m. Las hojas compuestas se disponen alternadamente en los tallos y son de tamaño medio a grande (10 a 20 cm de largo), con nueve o más folíolos de color verde cuyo tamaño es mayor cuanto más alejados se encuentran del nudo de inserción, son planos o cóncavos y con velloso variable. Las flores son de tamaño mediano (2 cm) y dispuestas en una inflorescencia cimosa; estas flores son hermafroditas, pentámeras, con cáliz gamosépalo, corola de color blanco a púrpura y cinco estambres de color amarillo que cubren un ovario bilocular. El fruto producido por autofecundación, es una baya bilocular redondeada de color verde que contiene cerca de 200 semillas, muy similar a un jitomate *cherry* (Figura 1).

El sistema caulinar presenta un desarrollo subterráneo representado por numerosos rizomas, mal llamados estolones que se originan alternadamente en los nudos de los tallos bajo la superficie del suelo. Los rizomas en su extremo distal forman tubérculos, que después de un crecimiento más o menos pronunciado constituyen las papas (Bouzo, 2009).

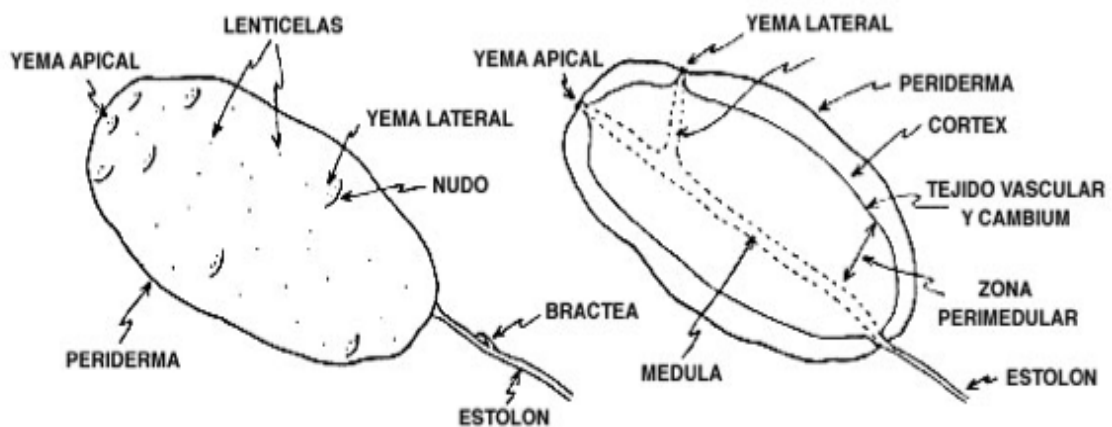


**Figura 1.** Anatomía de la planta de papa  
 (<http://www.potato2008.org/es/lapapa/index.html>)

### **El tubérculo**

Bajo condiciones fisiológicas y ambientales determinadas, los rizomas experimentan la diferenciación de tubérculos en la zona próxima a su yema apical, lo que se evidencia primero por un engrosamiento del primer entrenudo en alargamiento, ubicado a menudo después de ocho yemas del ápice meristemático. Procesos de división y elongación celular en esta zona y en los entrenudos vecinos resultan en la formación de una estructura de forma variable según el cultivar, pero a menudo esférica o elíptica y de peso también variable, desde unos pocos gramos hasta casi medio kilo de peso. En

tubérculos desarrollados se puede observar un periderma de color variable de casi blanco a negro, pasando por los colores marrón y rojizo más habituales. En el periderma se pueden ver las yemas típicas de un tallo, con la yema apical ubicada en el extremo distal, y la conexión o restos del rizoma en el extremo proximal del tubérculo, además, existen orificios que permiten la respiración, llamados lenticelas (Figura 2). Internamente, el tubérculo es generalmente de color blanco amarillento y presenta un gran desarrollo de células de parénquima del córtex y la médula, las que rodean los haces vasculares y almacenan una gran cantidad de granos de almidón, componente que contribuye de manera significativa al valor nutritivo del tubérculo.



**Figura 2.** Tubérculo de papa (Bouzo, 2009).

Una vez concluido el período de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan y los tubérculos se desprenden de los estolones. A partir de este momento, los tubérculos funcionan como depósitos de nutrientes que permiten a la planta subsistir en el frío y posteriormente reverdecer y reproducirse. De acuerdo con el método tradicional de implantación del cultivo, el tubérculo-semilla es el órgano responsable de dar origen a una nueva planta y de su grado de sanidad, así como de su estado fisiológico depende en gran parte el rendimiento final del cultivo (Bouzo, 2009).



Este tubérculo presenta en hojas, tallos y brotes un gran contenido de glicoalcaloides; solanina y chaconina, compuestos tóxicos que actúan como defensa natural de la planta contra hongos e insectos. Éstos se encuentran en mayor concentración inmediatamente debajo de la piel y aumenta su contenido por exposición a la luz, la cual provoca que las papas adquieran un color verde debido al aumento de clorofila, lo que también indica un aumento del contenido de solanina y chaconina, sustancias que no son destruidas mediante la cocción; es por ello que las papas deben almacenarse en lugares oscuros y frescos (FAO, 2008).

### **El cultivo de papa**

La papa es una planta que tiene una gran capacidad de adaptación.

Temperatura. Se trata de un cultivo esencialmente de clima templado, la temperatura representa la principal limitante para su producción. Las temperaturas inferiores a 10 °C y superiores a 30 °C inhiben decididamente el desarrollo del tubérculo, mientras que la mayor producción ocurre cuando la temperatura diaria se mantiene en promedio de 18 a 20 °C. Por ese motivo la papa se siembra a principios de la primavera en las zonas templadas y a fines del invierno en las regiones más cálidas; en los lugares de clima tropical caliente se cultiva durante los meses más frescos del año. En algunas tierras altas subtropicales, las temperaturas benignas y la elevada radiación solar permiten a los agricultores cultivar la papa todo el año y cosechar los tubérculos a los 90 días de haberlos sembrado, mientras que en climas más fríos, como en el norte de Europa, pueden ser necesarios hasta 150 días.

Suelo. Para la siembra de la planta de papa son recomendables tierras mullidas que proporcionen un adecuado drenaje y ventilación, de pH ligeramente ácido. Estas condiciones suelen darse en terrenos arenosos en los que el pH del suelo oscila entre 5.5 y 7, mientras que en terrenos arcillo-calizos se llegan a presentar valores de pH iguales o superiores a 8.

Riego. La papa es una planta que requiere humedad abundante y regular, durante el periodo de intensa tuberización puede necesitar hasta 80 m<sup>3</sup> de agua por hectárea al día. Es particularmente sensible a la sequía aunque un

exceso de agua produce disminución de su riqueza en fécula y favorece el desarrollo de enfermedades ([www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx)).

Fertilización. La fertilidad del suelo es un factor muy importante en la producción de papa por ser un cultivo de rápido desarrollo y por el hecho de que su materia seca total esté constituida en un 75 - 80% por carbohidratos. La síntesis de estos carbohidratos requiere la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio principalmente, y un aporte inadecuado de estos elementos tiene un efecto directo en el rendimiento del cultivo. Por ejemplo, la carencia de nitrógeno disminuye el crecimiento del follaje y reduce la cobertura del suelo, mientras que su exceso puede alargar el ciclo del cultivo e incrementar el riesgo de enfermedades en hoja.

La demanda de nutrientes a lo largo del ciclo del cultivo es variable, aproximadamente entre un 40 y un 50% son absorbidos en etapas tempranas, cuando aún la acumulación de materia seca es relativamente baja (Bouzo, 2009; Montaldo, 1984).

### **Factores que afectan el cultivo de papa**

El rendimiento del cultivo de papa, como el de la mayoría de los cultivos, está influenciado por cambios ambientales, siendo los de mayor impacto la precipitación pluvial, la radiación y la temperatura (Sauceda, 2010). La contaminación con agentes químicos u otro tipo de contaminantes ambientales también puede afectar el cultivo. Sin embargo, el hecho de que esta hortaliza se propague vegetativamente a través de su tubérculo la hace muy susceptible a diferentes patógenos y plagas de insectos, responsables de importantes pérdidas económicas, llegando en algunos casos a constituir una limitante para su cultivo.

Las malezas afectan la cantidad y calidad de los cultivos tanto de manera directa, al competir con las plantas de papa por agua, luz, nutrientes y espacio, como indirectamente, actuando como hospederos alternativos de muchas plagas, entre ellas los virus y como alimento para insectos vectores, permitiendo una rápida dispersión de la enfermedad como inóculo primario y como puente entre estaciones de cultivo (Ormeño y Sepúlveda, 2005).

## **Principales patógenos del cultivo de papa**

Una de las principales limitantes en el cultivo de la papa es la gran cantidad de patógenos fúngicos, bacterianos y virales que la atacan, entre ellos destacan:

### HONGOS

- Roña (*Spongospora subterranea*)
- Verruga (*Synchytrium endobioticum*)
- Tizón tardío (*Phytophthora infestans*)
- Pudrición rosada (*Phytophthora erythroseptica*)
- Oidiosis (*Erysiphe cichoracearum*)
- Tizón temprano (*Alternaria solani*)
- Esclerotiniosis (*Sclerotinia sclerotiorum*)
- Pudrición basal (*Sclerotium rolfsii*)
- Torbo (*Rosellinia sp.*)
- Rizoctoniosis (*Rhizoctonia solani*)
- Pudrición seca y marchitez por fusarium (*Fusarium spp.*)
- Marchitez por Verticillium (*Verticillium albo-atrum, V. dahliae*)

### BACTERIAS

- Marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*)
- Pierna negra y Pudrición blanda (*Erwinia spp.*)
- Pudrición anular (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*)
- Sarna común (*Streptomyces scabies*)

### FITOPLASMAS

- Punta morada
- Escoba de bruja
- Bola de hilo

### VIROIDES

- "Potato Spindle Tuber Viroid" (PSTVd) (Salazar, 1997).

## VIRUS

- Enrollamiento de las hojas (PLRV "potato leafroll virus")
- Virus Y de la papa (PVY)
- Virus A de la papa (PVA)
- Virus X de la papa (PVX)
- Virus S de la papa (PVS)
- Virus M de la papa (PVM)
- Moteado de la papa andina (APMV)
- Virus latente de la papa andina (APLV)
- "Mop-top" de la papa (PMTV)
- "Cafico" y "Aucuba" (AMV, PAMV, TRSV, PBRV, TBRV)
- Amarillamiento de las nervaduras de la papa

## NEMÁTODOS

- Nemátodos del Quiste (*Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*)
- Nemátodos del Nódulo de la Raíz (*Meloidogyne spp.*)
- Falso Nemátodo del Nódulo de la Raíz (*Nacobbus aberrans*)
- Nemátodos de la Lesión Radicular (*Pratilenchus spp.*)

(Ardí y Gutierrez, 1996).

## **II. ENFERMEDADES VIRALES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE PAPA**

Las enfermedades virales son las responsables primarias de la degeneración gradual de las variedades, lo cual se traduce principalmente en la pérdida de rendimiento. Las mermas en la producción a través del uso de tubérculos-semilla de baja calidad a causa de virosis, han provocado pérdidas cuantiosas en diferentes países, como consecuencia de la ausencia de medidas de prevención adecuadas. En algunos casos sólo causan pérdidas cualitativas, que de igual manera ocasionan pérdidas económicas por la reducción del valor de mercadeo de los tubérculos (Salazar, 1997).

Los virus que infectan plantas son partículas infectivas, consideradas como parásitos intracelulares obligados, se componen generalmente por ácido ribonucleico (RNA) de hebra simple y positiva y sólo en pocos casos por ácido desoxirribonucleico (DNA) de hebra simple o doble, rodeado por una envoltura proteica (cápside). Éstos ingresan a la célula vegetal a través de heridas causadas por daños físicos, por el medio ambiente o por la acción de vectores, que pueden ser insectos, ácaros, nemátodos y ciertos hongos habitantes del suelo. Una vez en el citoplasma, el virus se desensambla, replica, traduce sus mensajeros a proteínas y se moviliza local y sistémicamente (Stange, 2006).

### **Mecanismos de transmisión de los virus**

Los virus no pueden penetrar la cutícula de las plantas, por ello no pueden transmitirse a través del viento ni del agua; como parásitos obligados que son, requieren de agentes que los transfieran de las células de plantas infectadas a las células de plantas sanas para dispersarse con éxito. Se pueden definir tres vías de transmisión:

1. Transmisión por propagación vegetativa. Cuando las especies que se propagan en forma agámica ya sea por bulbos, esquejes, estacas o tubérculos, son infectadas sistémicamente por virus, éstos se transmiten con alta eficiencia de la planta madre a la descendencia, permitiendo que la infección continúe de generación en generación (Conci, 2004).

La papa se multiplica tradicionalmente a partir de tubérculos-semilla, a través de los que se transmiten con gran facilidad algunos virus como el

PVY y PVX, dando lugar a la "degeneración" de la semilla. Este proceso se favorece cuando los productores inician el cultivo con tubérculos de la cosecha anterior, después de varias temporadas esto conduce a una reducción gradual en el rendimiento del cultivo.

2. Transmisión mecánica. Para que se lleve a cabo la transmisión mecánica de virus, se requiere de una herida en la planta infectada y que la savia infectada penetre al interior de la planta sana. Esto incluye la transmisión por maquinaria y herramienta agrícola contaminada, o por las manos de los operadores, y sólo ocurre con virus que alcancen una alta concentración en los tejidos epidermales de sus huéspedes y cuyas partículas son muy estables, entre ellos se encuentran el PVX, el virus del moteado de la papa andina (APMV), el PVY, y el virus latente de la papa andina (APLV) (Salazar, 1995).

3. Transmisión por vectores. Los virus representan el principal grupo de patógenos vegetales que necesitan de vectores para diseminarse. Sólo algunos grupos de insectos pueden transmitir virus, como los áfidos, la mosca blanca, trips, y los escarabajos. Los áfidos constituyen el grupo más importante, debido a los numerosos virus que transmiten. Pertenecen al orden Homoptera y a la familia Aphididae, se encuentran distribuidos principalmente en zonas templadas, son insectos pequeños de hasta 4 mm de longitud, existen adultos alados, que pueden ser transportados con la ayuda del viento a grandes distancias y ápteros, con tendencia a formar colonias en las partes tiernas de la planta y en el envés de las hojas (Ardí y Gutiérrez, 1996; Salazar, 1995).

Entre los áfidos, el *Myzus persicae* es el vector más frecuente y que más eficientemente transmite virus en el cultivo de papa. Como la mayoría de los artrópodos y nemátodos virulíferos, posee un aparato bucal comúnmente descrito como "perforador-chupador" con el que penetra la pared celular de la planta, dejando el contenido celular disponible como alimento. Este mecanismo no siempre daña la célula vegetal irreparablemente, lo cual es crucial para la supervivencia del virus que puede replicarse dentro de la célula en la que es depositado (Gray y

Banerjee, 1999). Es mediante este mecanismo que se transmiten los virus más importantes del cultivo de papa, el PLRV y el PVY.

Existen diferentes formas de transmisión de los virus por los insectos, que varían en el tiempo de adquisición del virus proveniente de la planta enferma, en el periodo de latencia o incubación en el vector y en el tiempo de inoculación a la planta sana. De acuerdo a todas estas variantes, los virus se denominan como:

- No persistentes, estos virus son adquiridos e inoculados en el transcurso de segundos o minutos, ya que se encuentran en altas concentraciones en tejidos superficiales de la planta (epidermales y subepidermales); en el vector, no requieren de un periodo de latencia antes de su transmisión, ni se replican en su interior. No son retenidos por el vector durante más de algunas horas, pues el áfido pierde rápidamente su infectividad, a esto se debe que no disipe el virus a grandes distancias, sino sólo entre plantas del mismo campo. También son referidos como no circulativos, ya que no penetran membrana celular alguna dentro del vector.
- Semipersistentes, cuando son retenidos en el vector por días o posiblemente semanas. Al igual que los no persistentes también son adquiridos e inoculados rápidamente, no requieren periodo de latencia ni se replican en el vector. Se consideran también no circulativos.
- Persistentes, una vez adquiridos permanecen asociados al vector por el resto de su vida. Requieren de periodos largos entre su adquisición e inoculación (de horas a días) y periodos de latencia de entre un día y varias semanas. Son conocidos también como virus circulativos por el hecho de ser transportados activamente a través de múltiples membranas celulares del cuerpo del vector, para finalmente quedar integrados en sus glándulas salivales y ser inoculados en el huésped. Como virus circulativos, pueden a su vez clasificarse en propagativos, si se replican en el interior de su vector además de replicarse en la planta huésped y en no propagativos, si sólo se replican en la planta a la que infectan, por lo que el vector sólo constituye un conducto para

diseminarse entre los organismos vegetales (Gray y Banerjee, 1999; Salazar, 1995).

La comprensión de la relación vector-virus, así como de los factores que se requieren para la transmisión exitosa del patógeno al huésped, son muy importantes para controlar la diseminación de enfermedades virales transmitidas por vectores en los cultivos. Los principales métodos para lograrlo están basados en limitar la adquisición del patógeno por el insecto, o en prevenir la transmisión del patógeno por el vector a los cultivos susceptibles. El impacto que puedan tener los insecticidas, para controlar la diseminación de una enfermedad determinada, depende de las características de transmisión del patógeno; éstos solamente son útiles en el caso de virus transmitidos en forma persistente (PLRV) (Purcell y Almeida, 2005; Salazar, 1995).

### **Virus de la papa de importancia económica**

Los virus de mayor relevancia que infectan el cultivo de papa debido a las pérdidas de rendimiento que ocasionan, son el virus X, el virus Y, el virus A, el virus S y el virus del enrollamiento de las hojas (Cuadro 1) (Ardí y Gutiérrez, 1996; Naik y Karihaloo, 2007; Salazar, 1995).

**Cuadro 1.** Virus de la papa, modo de transmisión, síntomas y pérdida potencial de rendimiento del cultivo

<b>PVX</b>	"Potato virus X" ( <i>Potexviridae</i> )	
	<b>Pérdida potencial de rendimiento: 10-20%</b>	
TRANSMISIÓN: Por tubérculos contaminados, contacto entre plantas y uso de herramienta contaminada.	SÍNTOMAS: Generalmente asintomático. Amarillamiento foliar, mosaicos y disminución en el tamaño de la hoja. Puede interactuar con PVY y PVA provocando mosaicos de síntomas más severos, así como de mayores pérdidas de rendimiento.	



<b>PVY</b>	"Potato virus Y" ( <i>Potyviridae</i> )	
	<b>Pérdida potencial de rendimiento: 10-80%</b>	
<p><b>TRANSMISIÓN:</b> Por tubérculos contaminados, por contacto y por áfidos (<i>Myzus persicae</i> principalmente) de forma no persistente.</p>	<p><b>SÍNTOMAS:</b>  <b>PVY<sup>0</sup></b> variante más común, causa síntomas de mosaico.  <b>PVY<sup>C</sup></b> nervaduras punteadas.  <b>PVY<sup>N</sup></b> necrosis en hojas. Infecciones mixtas dan variantes híbridas (<b>PVY<sup>N:O</sup></b> y <b>PVY<sup>NTN</sup></b> ).  <b>PVY<sup>NTN</sup></b> necrosis anular en la superficie del tubérculo.  Infecciones secundarias de mayor severidad que infecciones primarias. Variedades PVY pueden interactuar con variedades PVX y PVA resultando en mayores pérdidas.</p>	

<b>PVA</b>	"Potato virus A" ( <i>Potyviridae</i> )	
	<b>Pérdida potencial de rendimiento: 15%</b>	
<p><b>TRANSMISIÓN:</b> Por tubérculos contaminados, por vectores (<i>Myzus persicae</i> principalmente) de forma no persistente.</p>	<p><b>SÍNTOMAS:</b> Mosaico ligero y transitorio, particularmente presente en clima nublado. Decoloración de la parte de la hoja que no contiene venas. Infecciones secundarias más severas, con hojas con relieve, combinadas con apariencia vítrea. Infecciones mixtas con PVY o/y PVX con síntomas más severos.</p>	

<b>PVS</b>	"Potato virus S" ( <i>Carlaviridae</i> )	
	<b>Pérdida potencial de rendimiento: 10-40%</b>	
<p><b>TRANSMISIÓN:</b> Por tubérculos contaminados, por contacto y por vectores de forma no persistente.</p>	<p><b>SÍNTOMAS:</b> Aclaramiento del follaje, ahondamiento de venas en el anverso de la hoja, reducción del tamaño de la hoja, manchas necróticas cafés en hojas.</p>	

<b>PLRV</b>	"Potato Leaf Roll Virus " ( <i>Luteoaviridae</i> )
	<b>Pérdida potencial de rendimiento: 50-90%</b>
<b>TRANSMISIÓN:</b> Por tubérculos contaminados y por vectores ( <i>Myzus persicae</i> principalmente) de forma persistente.	<b>SÍNTOMAS:</b> <u>Infección primaria.</u> Hojas superiores ligeramente enrolladas, de color amarillo. La orilla puede presentar pigmentación púrpura. <u>Infección secundaria.</u> Las hojas de la base están exageradamente enrolladas y endurecidas. La planta crece más erecta y con entrenudos más cortos. La planta es amarillenta y a veces enana. En algunas variedades puede haber necrosis interna del tubérculo.

### Control de enfermedades virales

En la actualidad México cuenta con una economía muy activa, que incluye el intercambio comercial de una gran variedad de productos agrícolas. La importación de tubérculos-semilla de papa implica un riesgo potencial de introducir fitopatógenos, concediéndole mayor importancia a aquellos virus que aún no se encuentran en el país, o que están restringidos a un área limitada dentro del territorio nacional (cuarentenados). Con la finalidad de prevenir la diseminación de plagas que afecten este cultivo, la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) a través de la SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) regula y controla los aspectos fitosanitarios relacionados con la producción, industrialización y movilización de la papa, mediante las normas oficiales:

NOM-040-FITO-2002, Requisitos y especificaciones para la producción y movilización nacional de papa comercial.

NOM-041-FITO-2002, Requisitos y especificaciones fitosanitarios para la producción de material propagativo asexual de papa ([www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx)).

El control de las enfermedades virales que afectan el cultivo de papa se basa principalmente en métodos preventivos, como la eliminación de las plantas enfermas del campo en etapas muy tempranas, dejando sólo las sanas hasta la cosecha ("roguing"), la producción de semilla sana y la resistencia genética. En la actualidad es posible comenzar un programa con material completamente sano obtenido por cultivo de tejidos y su posterior multiplicación a través de generaciones sucesivas, evitando o reduciendo la reinfección. Sin embargo, para poder aplicar efectivamente cualquiera de estos métodos, se requiere de métodos sensibles y específicos de detección de virus, los cuales además deben ser sencillos y de bajo costo. Los métodos serológicos como ELISA y las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos son comúnmente empleados. Inclusive existen métodos aún más sensibles como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), pero debido a su elevado costo y la necesidad de infraestructura más sofisticada, su uso es más limitado en la detección rutinaria de los virus que infectan vegetales (Ardí y Gutiérrez, 1996; Salazar, 1995; 1997).

### **Detección de virus por técnicas serológicas, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

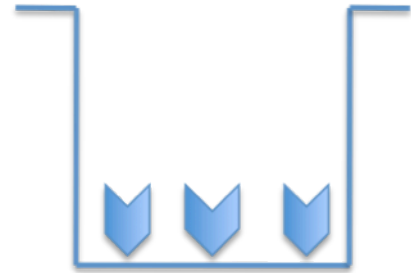
Los métodos inmunológicos son ampliamente utilizados en la detección de patógenos en áreas clínicas, agrícolas y ambientales. Utilizan inmunoglobulinas, que son glicoproteínas presentes en el suero y otros fluidos animales, producidas en respuesta a un antígeno y que funcionan como anticuerpos. Un diagnóstico inequívoco depende de la afinidad y especificidad del anticuerpo utilizado, lo que permite realizar la detección de bajas concentraciones de un patógeno.

ELISA es una técnica de laboratorio usada para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos de interés, en una amplia variedad de muestras biológicas. El formato más común para la detección de patógenos en plantas es el de doble anticuerpo o sandwich (DAS ELISA), consiste en adsorber anticuerpos a las paredes de una placa de plástico (poliestireno), a la que posteriormente se agregarán extractos de savia de la planta que se desea

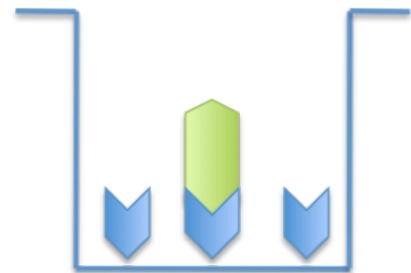
evaluar; si el antígeno está presente en la muestra éste será inmovilizado a las paredes de la placa. Un segundo anticuerpo que reconoce al antígeno inmovilizado y que tiene unida covalentemente una enzima, es agregado posteriormente. Al aplicar un sustrato cromogénico, utilizado por la enzima conjugada al segundo anticuerpo, se revela la presencia del complejo "anticuerpo-antígeno-anticuerpo+enzima" mediante el cambio de color, que puede ser cuantificado por medio de la determinación fotométrica del color desarrollado por el sustrato hidrolizado. La intensidad de color de las muestras positivas depende de manera directa de la concentración de antígeno presente y capturado. Los pozos con muestras negativas permanecen incoloros debido a que no reaccionan con el sustrato (Rosales, 2002).

Entre las características más relevantes de los métodos de inmunoabsorción enzimática para la detección de virus patógenos de plantas, están su elevada sensibilidad para la detección de un gran número de virus morfológicamente diferentes, tanto en soluciones purificadas, como en extractos herbáceos y cultivos de plantas infectadas; su especificidad, rapidez, y la posibilidad de estimar cuantitativamente la concentración viral presente (Figura 3) (Clark y Adams, 1997; Khan *et al.*, 2003; Valenzuela *et al.*, 2003).

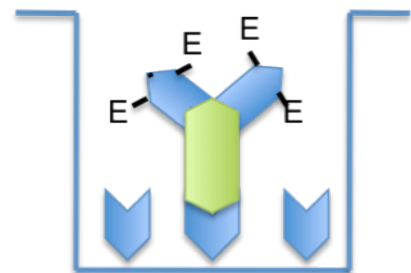
1. El anticuerpo específico para el virus que se desea detectar, es adsorbido en una superficie sólida de poliestireno (microplaca).



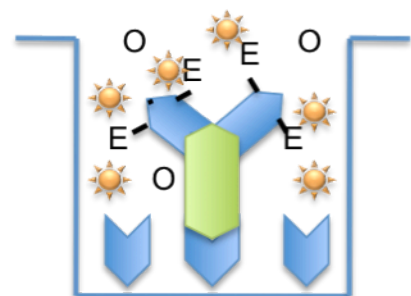
2. El virus presente en la muestra a examinar, es selectivamente atrapado e inmobilizado por el anticuerpo adsorbido en la microplaca.



3. El virus atrapado reacciona con otro anticuerpo, al cual se le ha ligado a una enzima.



4. La enzima ligada al anticuerpo, que ahora forma un complejo con el virus y el anticuerpo atrapado a la superficie de la microplaca, reacciona con su sustrato, que es adicionado, desarrollando un compuesto colorido cuya intensidad es posible cuantificar.



**Figura 3.** Pasos involucrados en la técnica de ELISA

### III. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el crecimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos aislados de la planta madre, empleando medios nutritivos artificiales, en condiciones asépticas. La capacidad de las células cultivadas de proliferar y organizarse para formar cultivos y eventualmente desarrollar una planta completa es denominada totipotencia (George *et al.*, 2008; Khachatourians *et al.*, 2002). Este atributo sólo está presente en las células de tejidos jóvenes y meristemas, y puede presentarse en algunas células diferenciadas, pero no en aquellas que han completado el desarrollo de estructuras especializadas (George *et al.*, 2008; Loyola y Vázquez, 2006).

El cultivo de tejidos se ha convertido en una herramienta fundamental para la biotecnología moderna, sus aportaciones prácticas van desde estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva de individuos seleccionados, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios y el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, selección *in vitro*, e introducción de genes (transformación genética), etc. (Pérez-Ponce, 1998).

#### **Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro***

Para llevar a cabo el establecimiento de un cultivo de células o tejidos vegetales es necesario considerar diversos factores que variarán de acuerdo con el objetivo que se persiga. Es importante enfatizar que el uso de CTV para ser aplicado en la agricultura, debe lograr como producto final la regeneración de plantas completas (Roca y Mroginski, 1991).

Explante: Todo cultivo de tejidos parte de material vegetal que puede obtenerse de una porción de tejido, de órganos, o de plantas completas. Su elección estará determinada por el propósito del cultivo y la especie vegetal utilizada. La respuesta de los explantes cultivados puede variar notablemente de acuerdo con su estado de desarrollo, su tamaño y la edad ontogénica de los mismos (Roca y Mroginski, 1991; George *et al.*, 2008).

Debido a que el cultivo se inicia en un medio nutritivo favorable para el crecimiento del explante, y para el crecimiento de microorganismos (bacterias, hongos), éste debe establecerse y mantenerse en condiciones asépticas, evitando así la competencia adversa entre contaminantes y el material vegetal que se desea desarrollar en condiciones *in vitro*. Para lograr dichas condiciones, es necesario tratar el material vegetal con diversos químicos que eliminen los microorganismos superficiales, esterilizar las herramientas necesarias para la disección del explante, así como los recipientes y el medio nutritivo en los que se desarrollará el cultivo. El aislamiento y transferencia del explante se lleva a cabo en campanas de flujo laminar, en las que los microorganismos puedan ser excluidos (George *et al.*, 2008).

Medio: El material vegetal sólo puede crecer en condiciones *in vitro* cuando se provee de un medio especializado que consiste en una solución de sales, esto aunado a vitaminas, aminoácidos y una fuente de carbohidratos (comúnmente sacarosa) para reemplazar el carbón que la planta, en condiciones normales, fija de la atmósfera mediante fotosíntesis (Roca y Mroginski, 1991; George *et al.*, 2008).

Las fórmulas salinas basales de las soluciones de cultivo, suministran los elementos inorgánicos necesarios para el desarrollo de una planta completa, tanto los macronutrientes (N, K, Ca, P, Mg y S), los cuales desempeñan funciones esenciales en el desarrollo de las células vegetales, como fotosíntesis, respiración y síntesis de biomoléculas; como los micronutrientes (Fe, Ni, Cl, Mn, Zn, B, Cu y Mo) que se requieren en cantidades muy pequeñas y contribuyen principalmente en la regulación enzimática, en la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos. Estos nutrientes son absorbidos por las células vegetales, como cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ ), el nitrógeno es absorbido principalmente en la forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^-$ ), el fósforo como fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y el azufre como sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).

Los aminoácidos proporcionan a las células de la planta una fuente de nitrógeno disponible de manera inmediata, pueden adicionarse al medio de cultivo para satisfacer los requerimientos de nitrógeno reducido, particularmente en aquellos que carecen de iones amonio. Son frecuentemente

utilizados glutamina, asparagina, alanina, glicina y prolina; todos ellos en su forma L- que es la única biológicamente activa. En ocasiones es necesario adicionar vitaminas al medio de cultivo debido a que cuando las células y tejidos vegetales crecen en condiciones *in vitro*, algunas vitaminas esenciales, que normalmente son sintetizadas endógenamente, son sintetizadas pero en cantidades inferiores a las óptimas; principalmente son empleadas tiamina (B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (B<sub>3</sub>), piridoxina (B<sub>6</sub>), pantotenato de calcio (B<sub>5</sub>) y mio-inositol (George *et al.*, 2008).

Algunos medios de cultivo son suplementados con una variedad de extractos orgánicos que contienen constituyentes de naturaleza poco definida, como caseína hidrolizada, leche de coco, extractos de levadura o malta, etc. Éstos no son muy recomendables debido a que la calidad y cantidad de sus constituyentes pueden variar con la edad del tejido del cual proviene el extracto, lo cual afecta la reproducibilidad de los resultados; por ello se tiende a remplazarlos con otras sustancias orgánicas como aminoácidos (Razdan, 2003).

El crecimiento y desarrollo de los cultivos también depende de la administración de reguladores de crecimiento al medio, éstos son componentes que a muy baja concentración son capaces de modificar el crecimiento o la morfogénesis del cultivo. Entre los reguladores de crecimiento se encuentran auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etc.

De acuerdo con el objetivo que persiga el cultivo, es necesario mantener un balance apropiado entre auxinas y citocininas en el medio, para ello es importante considerar las concentraciones endógenas presentes en el explante, lo cual dependerá a su vez de la especie, el tipo de explante empleado y la edad del organismo del que proceda el explante (Pérez-Ponce, 1998; Sathyanarayana y Varghese, 2007). En CTV las auxinas intervienen en la división, el crecimiento y la diferenciación de las células, inducen la elongación celular debido a que aumentan la plasticidad de la pared y la penetración de agua, participan en el desarrollo y crecimiento de brotes, raíces y callos. Mientras que el principal papel las citocininas, es promover la división celular, la modificación de la dominancia apical y la diferenciación de los brotes (Pérez-Ponce, 1998; Sathyanarayana y Varghese, 2007).



El caso de las giberelinas es más complejo, ya que en algunas especies estas hormonas son requeridas para estimular crecimiento y en otras para inhibirlo, incrementan el crecimiento de cultivos celulares a baja densidad, promueven el crecimiento de callo, e inducen plantas enanas o achaparradas a alargarse. GA<sub>3</sub> es la giberelina empleada más comúnmente. El ácido abscísico estimula o inhibe el crecimiento de callo, dependiendo de la especie (Razdan, 2003).

La adición de un agente gelificante permite la solidificación parcial del medio de cultivo, lo cual le puede conferir atributos particulares en cuanto a la disponibilidad de nutrientes, reguladores de crecimiento y productos de desecho del metabolismo (George *et al.*, 2008).

Tanto los componentes del medio del cultivo como el tipo y concentración de reguladores de crecimiento empleados, repercuten directamente en el abastecimiento de nutrientes y sustancias necesarias para el desarrollo de células, tejidos u órganos (Mejía-Muñoz *et al.*, 2006).

Incubación: Una vez iniciados los cultivos, son colocados en ambientes con luz, temperatura y humedad controladas. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad, el cual se logra empleando lámparas fluorescentes. En cuanto a la temperatura, entre 25 y 28 °C son adecuados para el establecimiento de cultivos (Roca y Mroginski, 1991; George *et al.*, 2008).

### **Cultivo de tejidos vegetales en la propagación de plantas**

El objetivo de la propagación de plantas vía cultivo de tejidos, también llamado micropropagación o clonación, es reproducir plantas de manera vegetativa, a gran escala y en espacios reducidos, creando una población en donde todos los individuos presenten la misma constitución genética que la planta madre.

Existen tres vías para llevar a cabo la micropropagación de plantas:

- Partiendo de brotes, yemas o meristemas pre-existentes a los que se induce crecimiento y proliferación.
- Mediante inducción de nuevos brotes, a partir de órganos de la planta madre siguiendo la ruta organogénica (caulogénesis o rizogénesis). La organogénesis puede ocurrir directa o indirectamente.

- A través de la formación de embriones somáticos que pueden posteriormente desarrollar plántulas. De igual manera, la embriogénesis puede ocurrir de manera directa o indirecta (Roca y Mroginski, 1991; George *et al.*, 2008).

Tanto la organogénesis como la embriogénesis indirecta van acompañadas de una fase previa a la regeneración de estructuras especializadas u órganos. Ésta, es una fase de proliferación de masas celulares desorganizadas e indiferenciadas llamadas callo, su formación *in vitro* se induce bajo el estímulo de reguladores de crecimiento tanto endógenos, como de aquellos adicionados al medio de cultivo; de este modo, el metabolismo de las células del explante es modificado y comienzan una activa división, revirtiendo los procesos de diferenciación y especialización que hubieran presentado en la planta intacta y dando origen a este nuevo tejido, compuesto por células meristemáticas sin especialización alguna. En el caso de micropropagación, no es favorable optar por procesos morfogénicos indirectos, ya que la formación de callos constituye un riesgo de obtener variación e inestabilidad genética en los individuos regenerados (Roca y Mroginski, 1991; George *et al.*, 2008).

Las ventajas más sobresalientes que ofrece la micropropagación sobre los métodos tradicionales de propagación son:

- Obtención de gran número de plántulas libres de enfermedades, partiendo de una sola planta, en un periodo corto de tiempo.
- La propagación puede llevarse a cabo durante todo el año, ya que las condiciones ambientales se pueden controlar artificialmente.
- El material de propagación puede mantenerse en un espacio reducido (Naik y Karihaloo, 2007).

Murashige (1974) propuso tres etapas fundamentales para micropropagar eficientemente una especie; estos pasos fueron ampliados más adelante por Debergh y Maene (1981) quienes añadieron dos más a este proceso, adoptado tanto por laboratorios de investigación como por laboratorios dedicados a la micropropagación comercial (Pérez-Ponce , 1998).

### Etapa 0: Selección y preparación de la planta madre

Para el establecimiento de un esquema de micropropagación exitoso, es de vital importancia seleccionar adecuadamente, o en algunos casos hacer crecer en invernadero, la planta donadora, ya que de su estado fisiológico y fitosanitario dependerá la calidad del explante. Dependiendo de su procedencia, las plantas donadoras deberán mantenerse en cuarentena o bajo un programa fitosanitario previo.

### Etapa I: Establecimiento de cultivos axénicos

Esta etapa consiste en la introducción del explante aislado y superficialmente desinfectado en el medio de cultivo, de tal manera que se logre una respuesta apropiada, ya sea crecimiento o formación de callo. En algunos casos se pueden utilizar antibióticos en el medio de cultivo para eliminar contaminantes superficiales adquiridos durante la disección del explante.

### Etapa II: Proliferación

Durante esta etapa el objetivo es inducir la multiplicación de órganos y estructuras capaces de originar plantas completas a través de la formación de brotes axilares, brotes adventicios, embroides, etc. Estos brotes, llamados también propágulos, pueden ser a su vez separados y transferidos a medio fresco en repetidas ocasiones para maximizar la población. En esta etapa no sólo es determinante el número de propágulos a obtener, sino su calidad genética ya que es en esta fase en la que se pueden producir variantes somaclonales.

### Etapa III: Preparación para el crecimiento en su ambiente natural

Es el paso previo a la transferencia a suelo. En esta etapa es necesario inducir la elongación y enraizamiento de los brotes propagados, a fin de que comiencen la absorción de nutrientes al trasplantarse a un sustrato enriquecido, con menor concentración de sales minerales, mayor concentración de sacarosa y un balance hormonal con ausencia o menor proporción de citocininas y mayor de auxinas. Es posible efectuar este proceso *ex vitro*, esto puede proporcionar ventajas prácticas y económicas.

#### Etapa IV: Aclimatización

Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos. Estas condiciones provocan cambios en la morfología y fisiología de las plántulas, presentan tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo. Para procurar un retorno gradual a las características naturales, las plantas obtenidas *in vitro* se transplantan a recipientes con suelo estéril y se cubren con películas plásticas que se perforan gradualmente hasta quedar eliminadas por completo, durante esta fase de endurecimiento las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% que posteriormente se sustituye por soluciones nutritivas menos complejas. El incremento de la intensidad luminosa, así como de la concentración de CO<sub>2</sub> de manera paulatina, han sido empleados con buenos resultados para aumentar su adaptación a las condiciones de campo. Esta etapa es crucial para la supervivencia de las plantas una vez que se transfieran a su ambiente natural y del resultado de ésta dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso (Roca y Mroginski, 1991; Pérez-Ponce, 1998; Loyola y Vázquez, 2005; Sathyanarayana y Varghese, 2007; George *et al.*, 2008).

#### IV. MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE PAPA LIBRES DE VIRUS

La aplicación de las herramientas biotecnológicas en el cultivo de papa, ofrece un gran potencial del cual nos podemos beneficiar enormemente, desde la propagación masiva a gran escala de material sano, la eliminación de virus contaminantes, la producción de semilla-tubérculo, la obtención de plantas transgénicas para la producción de variedades que posean altos rendimientos, calidad y resistencia a enfermedades, el mantenimiento de germoplasma, hasta la conservación de la diversidad biológica, sin considerar las numerosas áreas de investigación en las que se puede incursionar para ampliar el conocimiento de este cultivo (Gómez *et al.*, 1997; Vetía *et al.*, 2008).

##### **Micropropagación de papa**

En contraste con la propagación convencional de la papa a través de sus tubérculos, lo cual representa bajos índices de multiplicación con intervalos de entre 1:4 y 1:15 (Rabbani *et al.*, 2001), la micropropagación es una técnica alternativa que ofrece una rápida multiplicación masiva de la planta, además de ser confiable en términos del mantenimiento de la integridad genética de los clones multiplicados (Badoni y Chauhan, 2009).

Las condiciones necesarias para una regeneración eficiente, varían entre células de la planta y tejidos, así como entre especies y variedades. La formación de brotes y raíces depende principalmente del inóculo inicial o explante, y de la composición del medio de cultivo, incluyendo los reguladores de crecimiento con que sea suplementado el mismo (Hamdi *et al.*, 1998).

Explante. La papa ha mostrado una gran plasticidad en su desarrollo, haciendo posible la regeneración de plantas enteras a partir de diferentes fuentes de explantes: segmentos nodales de tallo y hojas, ya sea desarrolladas *in vitro* o *ex vitro* (Visser *et al.*, 1989; Hamdi *et al.*, 1998), discos de tubérculo (Ishige *et al.*, 1991; Hamdi *et al.*, 1998) y discos de microtubérculo (Snyder y Belknap, 1993; Hamdi *et al.*, 1998). Para poder incrementar la eficiencia de este proceso, es fundamental determinar el tipo de explante que mejor responda, de acuerdo con la variedad que se desea propagar.

Es muy importante, en la medida de lo posible, la selección de individuos sanos, como donadores de explantes, para ello es conveniente realizar pruebas de ELISA y así asegurar la sanidad del material vegetal con el que se va a iniciar la propagación de plantas.

El cultivo de segmentos nodales, en el cual las yemas apicales y axilares crecen formando plantas nuevas al cabo de tres semanas de haberse sembrado, es predominantemente utilizado para la multiplicación. Estas plantas pueden a su vez ser subcultivadas en medio fresco hasta obtener el número deseado de individuos. Es frecuente que después de dos o más subcultivos aumente el número de yemas que se producen a partir de un explante. Sin embargo, no es aconsejable mantener el material indefinidamente en etapa de multiplicación, pues aumenta el riesgo de que ocurran cambios genéticos. Debido a esto, de diez a doce sería el número máximo de subcultivos sugerido (Conci, 2004).

Medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado para la rápida multiplicación de plantas de papa es la fórmula de Murashige y Skoog (medio MS), desarrollada en 1962 para el crecimiento óptimo de callo de tabaco. Este medio favorece la supervivencia y la tasa de desarrollo de los inóculos y está caracterizado por su alta concentración de sales, particularmente de iones potasio, amonio y de mio-inositol, que repercuten en el abastecimiento de nutrientes y sustancias necesarias para el desarrollo de células, tejidos y órganos (Mejía-Muñoz *et al.*, 2006).

Para prevenir la contaminación bacteriana de los cultivos, así como para eliminar bacterias sistémicas, es común incorporar antibióticos en el medio de cultivo. Entre otros, la cefotaxima ha sido utilizada con éxito para estos fines (Lizárraga *et al.*, 1991).

Reguladores de crecimiento. La regeneración de brotes requiere la presencia de concentraciones y combinaciones apropiadas de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Se ha demostrado que los requerimientos hormonales para que la organogénesis *in vitro* se lleve a cabo eficientemente son altamente dependientes del genotipo, variando entre especies y entre variedades de una misma especie (Hamdi *et al.*, 1998; Sarker y Mustafa, 2002; Jiménez *et al.*, 2009).

La relación auxina-citocinina es de vital importancia en la organogénesis, sin embargo, algunos autores han citado la necesidad de utilizar giberelinas para que la regeneración se lleve a cabo eficientemente (Jiménez *et al.*, 2009). En la literatura se encuentran reportadas diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento, utilizadas en la regeneración de diversas variedades de papa. Podemos encontrar trabajos en los que se utilizó ácido naftalenacético (ANA), como fuente de auxina responsable de una rápida respuesta morfogénica cuando se ocupó en bajas concentraciones (Jiménez *et al.*, 2009), o como promotor del aumento de la formación de callo (Yasmin *et al.*, 2003; Mejía-Muñoz *et al.*, 2006), así como protocolos en los que la presencia de auxinas en el medio no fue requerida para el desarrollo morfogénico del explante (Gómez *et al.*, 1997; Sarker y Mustafa, 2002).

La influencia de la zeatina (Z) y la zeatina ribósido (ZR) ha sido destacada en varios trabajos, acelerando la formación de yemas y promoviendo la formación de brotes. Sus efectos están estrechamente ligados al nivel de auxina presente en el medio (Hamdi *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2009). Otros estudios reportan exitosamente 6-bencilaminopurina (BA) como citocinina en el medio de cultivo (Rabbani *et al.*, 2001; Yasmin *et al.*, 2003; Mejía-Muñoz *et al.*, 2006). La presencia de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), estimula la iniciación y formación de tallos adventicios, así como también actúa intensificando la respuesta de otros reguladores, favoreciendo así la organogénesis (Rabbani *et al.*, 2001; Yasmin, *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2009).

### **Eliminación de virus**

El control efectivo de insectos en los campos de cultivo de papa es una labor extremadamente difícil, y por tanto, la diseminación de enfermedades sistémicas mediante insectos es prácticamente inevitable. Las elevadas probabilidades de que las plantas adquieran infecciones virales, hace que los métodos convencionales de producción de tubérculos sanos sean imprácticos, (Wang y Hu, 1982).

Una larga lista de especies han sido liberadas de virus a través de la regeneración de plantas *in vitro*. El sistema más frecuentemente utilizado y con mayores éxitos es el cultivo de meristemos, suplementado en muchos casos

por tratamientos de termoterapia y quimioterapia. Algunos ejemplos se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Ejemplos de especies liberadas de virus mediante técnicas *in vitro*

Especie	Virus	Técnica	Cita
Albaricoque ( <i>Prunus armeniaca</i> L.)	<i>Plum pox virus</i> (PPV)	Cultivo de yemas + termoterapia	Koubouris <i>et al.</i> , 2007
Caña de azúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)	Virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV)	Cultivo de meristemos	Naz <i>et al.</i> , 2009
Uva ( <i>Vitis vinifera</i> L.)	<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	Quimioterapia (Ribavirina)	Weiland <i>et al.</i> , 2004
Ajo ( <i>Allium sativum</i> L.)	<i>Onion yellow dwarf virus</i> (OYDV) <i>Leek yellow stripe virus</i> (LYSV) <i>Carnation latent virus</i> (CLV) <i>Shallot latent virus</i> (SLV)	Cultivo de yemas + termoterapia	Torres <i>et al.</i> , 2000
Oca ( <i>Oxalis tuberosa</i> )	<i>Arracacha virus B</i> (AVB) <i>Papaya mosaic virus</i> (PapMV) <i>Ullucus mild mottle virus</i> (UMMV)	Termoterapia + quimioterapia (Ribavirina)	Fletcher & Fletcher, 2001

### Cultivo de meristemos

El cultivo de meristemos representa un método reproducible y económicamente factible, para la producción de plantas libres de patógenos. Esta técnica fue aplicada por primera vez para la erradicación de virus en dalias hace unos sesenta años, por Morel y Martin (1952).

El meristemo es el punto activo de crecimiento del ápice de la raíz o del brote de una planta, es una zona pequeña, compuesta de células en continua división. El domo de la yema apical contiene las verdaderas células meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias.

Los virus en la planta no están uniformemente distribuidos. En las infecciones sistémicas algunos están limitados al floema o a pocas células parenquimáticas adyacentes; otros involucran a todas o casi todas las células de la planta. Existen otros virus que dejan sectores de tejidos sin infectar y sólo



unos pocos invaden los tejidos meristemáticos. Esto puede tener diversas explicaciones:

- El floema, el sistema vascular a través del cual se distribuyen sistémicamente los virus, no se encuentra desarrollado en la región meristemática, por lo tanto, el avance lo llevan a cabo solamente a través del movimiento célula a célula, lo cual evita o aminora la invasión en esta zona de la planta.
- La elevada actividad metabólica durante la mitosis y el alto contenido de auxinas en el meristemo, pueden inhibir la multiplicación viral, interfiriendo con el metabolismo del ácido nucleico del virus.
- La existencia de un sistema que inactive los virus, con mayor actividad en la región apical, que en ninguna otra parte de la planta. (Lizárraga *et al.*, 1991; Conci, 2004; Naik y Karihaloo, 2007)

El aislamiento en condiciones asépticas de la porción apical (0.1 - 0.5 mm), y su cultivo en un medio nutritivo adecuado e igualmente aséptico, permite el desarrollo de plántulas. Este procedimiento es necesario realizarlo con la ayuda de herramientas de disección finas y bajo un microscopio estereoscópico, su disección y manipulación requiere de un alto grado de experiencia del personal que lo va a realizar y el crecimiento de las plantas puede llevar más de cuatro meses. En general, mientras mayor sea el tamaño del tejido aislado, mayores son las probabilidades de su sobrevivencia en condiciones *in vitro*, sin embargo, mientras más pequeño sea el meristemo aislado, mayores serán las probabilidades de ser liberado de la presencia de virus (Wang y Hu, 1980). Todo esto ofrece como resultado, un bajo porcentaje de plantas regeneradas libres de virus, por lo que se recurre a la combinación de esta técnica con termoterapia o quimioterapia, para incrementar las probabilidades de obtener plantas libres de virus.

Como es de esperarse, tanto el medio de cultivo como los reguladores de crecimiento utilizados para el cultivo de meristemas, son cruciales para una regeneración de plantas exitosa, aunque no podemos dejar de lado el genotipo del material vegetal empleado (Badoni y Chauhan, 2009).

Existen otras aplicaciones atractivas del cultivo de meristemas, entre ellas están la conservación de germoplasma a baja temperatura, o criopreservación.

### Termoterapia

La replicación de varios virus vegetales se reduce significativamente cuando la planta huésped, crece a elevadas temperaturas, es posible que esto ocurra debido a una interrupción en la actividad de las proteínas involucradas en el movimiento célula a célula de los virus, a través de plasmodesmos (Naik y Karihaloo 2007); otra explicación a este fenómeno es la degradación de la cubierta que protege el ácido nucleico del virus, compuesta por muchas subunidades de proteína, a altas temperaturas la unión entre estas subunidades se debilita, permitiendo el ataque de las nucleasas presentes en la célula vegetal (Lizárraga *et al.*, 1991).

La termoterapia aplicada a la planta entera, o a los tubérculos ya brotados, seguida por cultivo de meristemos, ha sido exitosamente utilizada para la eliminación de muchos virus de papa, especialmente del virus del enrollamiento de la hoja (PLRV).

Un ejemplo de esta técnica, es el procedimiento estándar empleado en el Centro Internacional de la Papa (CIP). La planta es "decapitada" antes de ser tratada con termoterapia, de tal manera que las yemas axilares se encuentran creciendo mientras se aplica un régimen de temperatura diaria de 36 °C por 16 horas y 30 °C por 8 horas bajo luz continua, durante cuatro semanas. Posteriormente se aíslan los meristemos y se cultivan para continuar con el proceso de desarrollo. Esta terapia puede aplicarse también a plántulas *in vitro* (Lizárraga *et al.*, 1991; Conci, 2004; Naik y Karihaloo, 1997).

### Quimioterapia

El uso de compuestos antivirales incorporados al medio de cultivo, ha complementado los procesos de eliminación de virus en plantas. Éstos suelen inhibir o interferir la replicación o el movimiento viral. Han sido evaluadas diferentes sustancias, la más utilizada es la Ribavirina o Virazole (1-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), que es un análogo de la guanosina (Lizárraga *et al.*, 1991; Naik y Karihaloo, 1997; Conci, 2004). Se han reportado resultados positivos para la erradicación de PVX, PVY, PLRV y PVS mediante el uso de Ribavirina a concentraciones de 10 y 20 µg/ml (Klein y Livingston, 1983; Nasir *et al.*, 2010).

## **Producción de microtubérculos**

Las plántulas crecidas en condiciones *in vitro* pueden utilizarse para la producción de microtubérculos en el laboratorio. Los microtubérculos son tubérculos miniatura desarrollados *in vitro*, bajo ciertas condiciones. Son muy pequeños (peso promedio 100-150 mg) y muy convenientes para su manipulación, almacenamiento y transporte a distancias largas, además de poder utilizarse como semillas (Naik y Karihaloo, 2007).

La tuberización es inducida por cambios hormonales endógenos y/o exógenos, particularmente por un desbalance hormonal debido a la alteración en concentraciones de citocininas y auxinas en el medio de cultivo (Wang y Hu, 1982), por el incremento de carbohidratos (Coria *et al.*, 2004), por la adición de retardantes de crecimiento como Daminozida (B9), cloruro de colina (CCC) (Hussain *et al.*, 2006), por la acción de hormonas como cinetina (Palmer y Smith, 1970), 6-bencilaminopurina (BA) (Yousef *et al.*, 1997; Hussain *et al.*, 2006), ácido abscísico (ABA) u otras sustancias como cumarinas, jasmonatos, etc. Otros factores importantes son el fotoperíodo y el soporte utilizado en el medio de cultivo, ya que se ha comprobado que existe una relación directa entre el peso fresco del microtubérculo y el soporte utilizado (Borda *et al.*, 2001). En todos los casos se reporta la existencia de una alta dependencia genotípica para que se lleve a cabo la microtuberización, en presencia de distintos inductores.

Algunos autores consideran a las citocininas como los inductores más fuertes de la tuberización, siendo cinetina una de las más potentes por promover división celular y por ser requerida para la síntesis y acumulación de almidón en la tuberización (Palmer y Smith, 1970). En general, el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo a 80 g/L, ha reflejado un incremento en el porcentaje de microtubérculos obtenido y una disminución en el tiempo en el que comienza este proceso (Wang y Hu, 1982). Esto puede deberse a que la sacarosa actúa no sólo en la síntesis de carbohidratos, sino además como un regulador osmótico de los niveles endógenos de ácido giberélico, que aparentemente inhibe la tuberización (Coria *et al.*, 2004).

Los microtubérculos comienzan a crecer dentro de las primeras 2 semanas, dependiendo del genotipo, y pueden cosecharse después de 60 a 75

días de incubación. Antes de cosecharse deben dejarse durante 10 a 15 días bajo luz difusa o artificial para permitir su reverdecimiento, durante el cual endurecen la piel, acumulan glicoalcaloides, que les proporcionan protección contra enfermedades fúngicas y bacterianas, además de evitar pérdidas importantes debido a encogimiento, pudrición o brotación excesiva. Una vez cosechados los microtubérculos deben lavarse, tratarse con una solución fungicida, dejar a que sequen en la oscuridad, empacarse en bolsas de polietileno perforadas y almacenarse por 3 a 4 meses entre 5 y 6 °C, hasta ser liberados de su periodo de dormancia, para después poder ser cultivados.

En la actualidad es posible producir microtubérculos masivamente, con el uso de biorreactores y sistemas automatizados, que emplean medios de cultivo líquidos administrados por inmersión temporal, lo cual permite crear dentro de cada reactor, una atmósfera que es renovada casi en su totalidad a intervalos regulares, permitiendo así la eliminación de gases tóxicos y logrando una mayor disponibilidad y asimilación de nutrientes. Estos sistemas constituyen una alternativa de interés para la producción de tubérculos *in vitro* de papa, no sólo por la inducción de un mayor número de tubérculos, sino por el incremento en peso y tamaño de los mismos, consiguiendo así la obtención de semilla de papa de elevada calidad fitosanitaria (Pérez *et al.*, 2001).

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

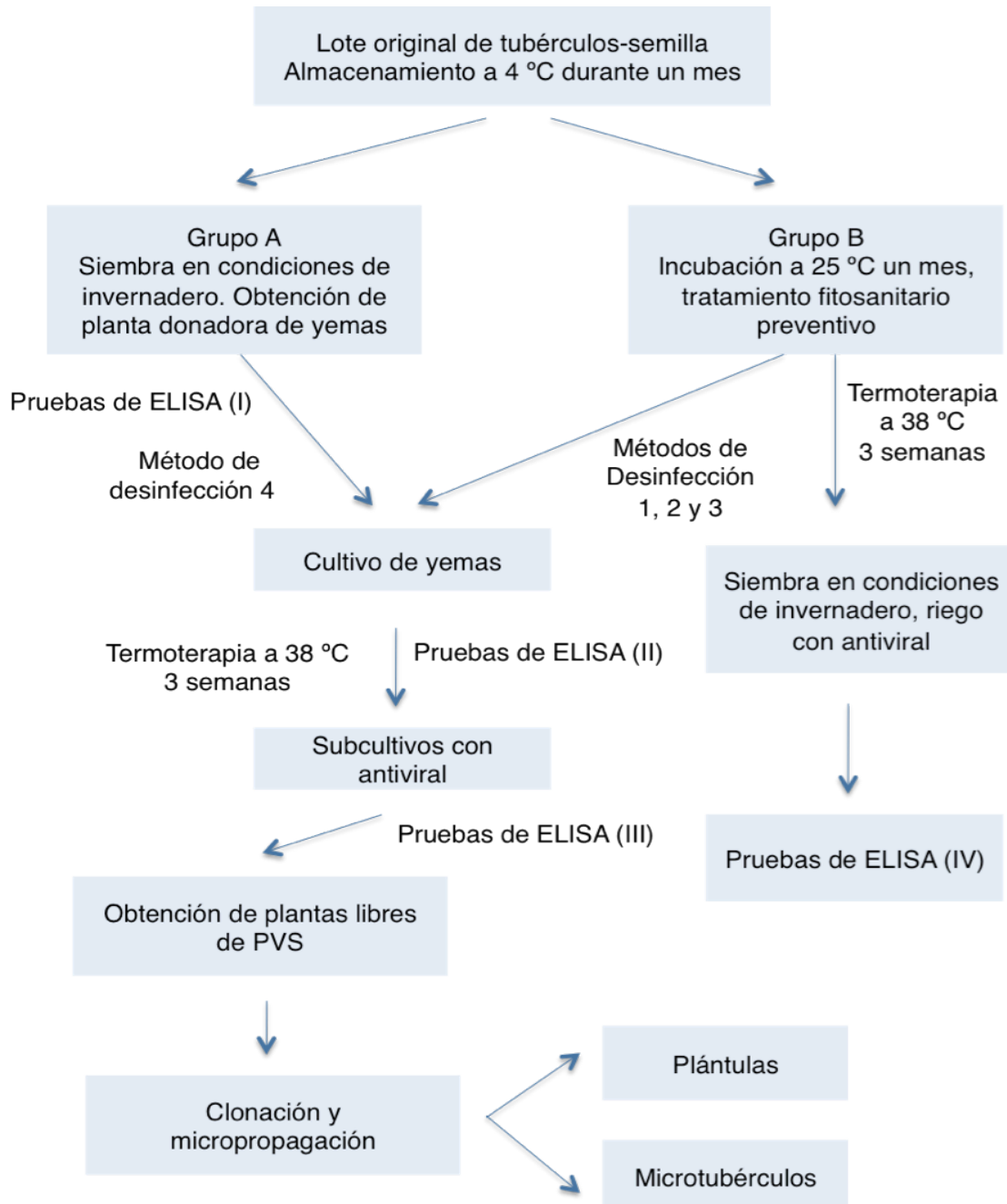
Obtener plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.) libres de virus a partir de tubérculos-semilla de una variedad comercial.

### **Objetivos particulares**

- Detectar la presencia de virus X, Y, A y S mediante técnicas de ELISA, en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.).
- Establecer cultivos para la regeneración de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), en condiciones *in vitro*.
- Micropropagar el material regenerado, mediante subcultivos periódicos.
- En plantas a las que se haya detectado la presencia de virus, eliminar los virus infectantes mediante el uso de termoterapia, quimioterapia y/o cultivo de yemas.
- Seleccionar las condiciones para inducir el desarrollo de microtubérculos en las plantas regeneradas en condiciones *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo siguiendo la ruta crítica que se describe en la Figura 4.



**Figura 4.** Ruta crítica para la obtención de plantas de papa libres de virus

### **Lugar de ejecución**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La detección de los diferentes virus mediante la prueba serológica de ELISA, se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Javier Plasencia y la asistencia técnica de la M. en C. Diana Sánchez Rangel.

### **Material biológico**

Se partió de un lote de 155 tubérculos-semilla de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Fiannas, los cuales presentaban brotes múltiples y en desarrollo (Figura 5).

Los tubérculos se clasificaron por su tamaño y se desecharon quince que presentaban daño o algún síntoma de enfermedad. Se almacenaron durante un mes aproximadamente a 4 °C bajo condiciones de oscuridad.



**Figura 5.** Tubérculos-semilla de papa, variedad Fiannas

Posteriormente, el lote original se dividió en dos grupos: (Figura 4).

#### Grupo A. Obtención de planta donadora de yemas.

Del lote original, se sembraron 85 tubérculos bajo condiciones de invernadero en cajas plásticas de 40 x 60 cm, utilizando como sustrato una mezcla de peatmoss (45%), agrolita (45%) y arena (10%). Las cajas se mantuvieron en invernadero y se regaron 2 veces por semana con agua corriente, aplicando en el riego una vez cada 2 semanas, una solución de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 25% y  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA (6-bencilaminopurina). Durante el desarrollo de las plantas en el invernadero, se aplicó en repetidas ocasiones insecticida casero Raid y Furadan<sup>®</sup> 350 L para eliminar los insectos presentes, principalmente mosca blanca.

#### Grupo B. Tratamiento fitosanitario preventivo

Los 55 tubérculos-semilla restantes, se mantuvieron en un cuarto de incubación a 25 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Durante la incubación los tubérculos se sometieron a un programa fitosanitario, regándolos por aspersión una vez a la semana con una solución compuesta por:

- Agrimycin 500<sup>®</sup>  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Benlate<sup>®</sup>  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Tritón 100 (3 gotas por cada 100 ml de solución)
- BA  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Después de 5 meses de haber comenzado el tratamiento fitosanitario los tubérculos se sembraron bajo condiciones de invernadero en cajas plásticas de 40 x 60 cm, utilizando un sustrato orgánico estéril. El riego se realizó 2 veces por semana con agua corriente, aplicando en él una vez cada 2 semanas una solución de sales MS (Murashige y Skoog) al 25% y  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, y una vez por semana  $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ribavirina (antiviral). Durante su desarrollo, se aplicó insecticida casero Raid y Furadan<sup>®</sup> 350 L para eliminar cualquier insecto presente.



## **Aspectos generales**

### **1. Preparación de medios de cultivo.**

Los medios de cultivo empleados en este trabajo se basaron en los utilizados por el Centro Internacional de la Papa (Tissue culture, CIP training manual) los cuales emplean las sales del medio Murashige y Skoog (1962) (Anexo 1), adicionados con sacarosa comercial, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y agente gelificante. Además, los medios fueron suplementados con antibiótico, antiviral y antimicótico, como se explicará más adelante. Los componentes de los medios de cultivo empleados en las diferentes etapas de este trabajo se pueden observar en el Cuadro 3.

La preparación de medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas 100X (Anexo 1), el pH se ajustó a 5.7 y se esterilizaron en autoclave vertical a 122 °C, 1.2 kg·cm<sup>-2</sup> durante 18 minutos. Una vez esterilizados los medios y cuando alcanzaron una temperatura aproximada de 40 °C, se añadió el antibiótico, el antiviral y el antimicótico dentro de la campana de flujo laminar, manteniéndolos en agitación continua para homogeneizar la solución. Los medios de cultivo se dosificaron en tubos de ensaye a razón de 20 ml por tubo, frascos de vidrio de alimento infantil a razón de 30 ml por frasco o tarros cuadrados grandes a razón de 100 ml por frasco.

### **2. Incubación.**

Los cultivos se incubaron a 25 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad.

**Cuadro 3.** Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados (1L de medio) (Basados en el CIP, ajustados a stocks del lab CTV)

	INDUCCIÓN	PROLIFERACIÓN	TUBERIZACIÓN	MANTENIMIENTO
Sales MS	100%	100%	100%	100%
Vitaminas St (Anexo 1)	100%	100%	-	100%
AG <sub>3</sub>	1 mg 0.5 mg	-	-	-
BA			5 mg	
Sacarosa	25 g	25 g	80 g	20 g
Sorbitol	-	-	-	40 g
Gelificante	3.3 g Gellan	3.3 g Gellan	9 g Agargel	8.5 g Agargel
Cefotaxima	0.325 g	0.325 g	0.325 g	0.325 g
Nistatina	600,000 UI	-	-	100,000 UI
Ribavirina		20 mg	20 mg	20 mg

## **Establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Fiannas**

### **1. Selección del explante**

Para seleccionar el explante adecuado con el cual se llevaría a cabo el establecimiento de cultivos *in vitro* de planta de papa, se probaron dos fuentes de explante (Figura 6):

- Yemas apicales y axilares procedentes de plantas crecidas en condiciones de invernadero (Grupo A).
- Yemas obtenidas de los brotes de tubérculo-semilla (Grupo B).

El tipo de explante óptimo se seleccionó de acuerdo a la capacidad de desarrollar plántulas libres de contaminación.



**Figura 6.** Fuentes de explantes empleadas:

a) yemas apicales de plantas crecidas en invernadero; b) yemas axilares de plantas crecidas en invernadero; c) yemas de brotes de tubérculo

### **2. Desinfección de explantes**

Para llevar a cabo la desinfección superficial, se sometieron a diferentes tratamientos de desinfección:

- Segmentos apicales y nodales de tallo, de las plantas crecidas en condiciones de invernadero (Grupo A).
- Tubérculos-semilla sometidos a incubación de 25 °C y bajo programa fitosanitario (Grupo B).

Cada tratamiento se probó de manera consecutiva modificando la concentración y tiempo de exposición de las diferentes sustancias desinfectantes, hasta lograr el establecimiento de cultivos estériles.

Una vez que el material vegetal (ápices, nudos y brotes) se lavó con agua corriente y jabón, se introdujo en una campana de flujo laminar para llevar a cabo la desinfección en un ambiente aséptico. Algunas de las sustancias empleadas en los tratamientos de desinfección, como las soluciones de Benlate<sup>®</sup>, Agrymicin 500<sup>®</sup>, antioxidantes, así como el agua utilizada para los enjuagues, fueron previamente esterilizadas en un autoclave vertical a 122 °C, 1.2 kg·cm<sup>-2</sup> durante 18 minutos (el agua fue sometida a esterilización durante 40 minutos). La solución de Nistatina empleada en el tratamiento 3 se filtró previamente con una membrana de 0.22 μm. El material vegetal sumergido en cada una de las soluciones, se mantuvo en agitación suave el tiempo indicado para cada tratamiento (Cuadro 4).

La efectividad de la desinfección se evaluó tomando en cuenta el porcentaje de plántulas desarrolladas libres de contaminación.

**Cuadro 4.** Tratamientos de desinfección probados para el establecimiento de cultivos de yemas de papa, variedad Fiannas

S U S T A N C I A S	T R A T A M I E N T O S			
	1	2	3	4
Agua y jabón	✓	✓	✓	✓
Etanol 70% (v/v)	1 min	1 min	1 min	1 min
Vanish <sup>®a</sup> (2 g·L <sup>-1</sup> )		15 min	15 min	15 min
Ketoconazol <sup>b</sup> (400 mg·L <sup>-1</sup> ) + Tritón 100 <sup>c</sup> (3 gotas)				20 min
NaClO <sub>2</sub> <sup>d</sup> 20% (v/v) + Tritón 100 <sup>c</sup> (2 gotas) +Microdyn <sup>®e</sup> (1 ml·100 ml <sup>-1</sup> de sol.)	15 min	15 min	15 min	10 min
H <sub>2</sub> O desionizada (enjuagues)	2	2	2	2
Benlate <sup>®f</sup> (4 g·L <sup>-1</sup> )	25 min	40 min	40 min	20 min
Agrimycin 500 <sup>®g</sup> (4 g·L <sup>-1</sup> )	20 min	40 min	40 min	20 min
Nistatina <sup>h</sup> (60,000 UI·L <sup>-1</sup> )			15 min	
H <sub>2</sub> O desionizada (enjuagues)	5	5	5	3
Ac. ascórbico + Ac. cítrico <sup>i</sup> (50 g·L <sup>-1</sup> c/u)	✓	✓	✓	✓

a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, blanqueador comercial, germicida; b) Antimicótico; c) Agente tensoactivo, surfactante; d) Blanqueador comercial, 6% de ingrediente activo, bactericida y viricida; e) Nitrato de plata, bactericida y viricida; f) Benomyl, fungicida sistémico; g) Sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre, bactericida y fungicida; h) Antimicótico; i) Solución antioxidante

### 3. Disección del material vegetal

Una vez que se llevó a cabo el tratamiento de desinfección, los explantes se mantuvieron en solución antioxidante durante todo el tiempo transcurrido entre la disección y siembra en los frascos con medio de cultivo. Las yemas provenientes de segmentos de tallo o de brotes de tubérculo, se disectaron individualmente con bisturí del número 3 y navajas del número 11, con el fin de sembrar la menor cantidad de tejido posible en medio de cultivo de inducción.

### 4. Siembra de yemas en medio de cultivo de inducción

Se sembraron 5 yemas aisladas de entre 0.5 y 1 cm, por cada frasco, o individualmente por cada tubo de ensaye con medio de inducción (Cuadro 3). Todos los cultivos se incubaron durante 3 a 4 semanas.

## **Proliferación y mantenimiento de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Fiannas**

Después de 3 ó 4 semanas de haber cultivado las yemas, las plántulas desarrolladas en el medio de inducción se subcultivaron en medio de cultivo de proliferación (Cuadro 3), para ello, dentro de la campana de flujo laminar se disectaron las plántulas en segmentos uninodales, colocando 5 estacas por frasco de alimento infantil y hasta 20 estacas por tarro cuadrado. Los subcultivos se mantuvieron en incubación.

Para multiplicar la población de plántulas, se llevaron a cabo tres subcultivos. El segundo subcultivo se realizó entre las 5 y 6 semanas posteriores al primer subcultivo y el tercero alrededor de 10 semanas después de haber realizado el segundo subcultivo, hasta alcanzar una población de 1,000 individuos.

Con la finalidad de conservar una colección de los propágulos *in vitro*, se llevó a cabo un cuarto subcultivo en medio de mantenimiento (Cuadro 3), del 10% de la población resultante.

De igual manera que en los otros subcultivos, las plántulas se disectaron en segmentos uninodales dentro de la campana de flujo laminar y se sembraron 16 estacas por cada tarro cuadrado de medio de cultivo. Los subcultivos se mantuvieron en incubación.

**Detección de los virus PVA, PVS, PVY y PVX en plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero y en plántulas crecidas en condiciones *in vitro*, mediante técnica de ELISA**

Para llevar a cabo la detección de estos virus, se utilizaron kits de reactivos DAS ELISA, Alkaline phosphatase label, marca Agdia (Indiana, EUA):

PVA (No. catálogo SRA60000)

PVS (No. catálogo SRA40000)

PVX (No. catálogo SRA10000)

PVY (No. catálogo SRA20001)

El protocolo seguido fue el siguiente:

a) Inmovilización del anticuerpo de captura.

- Cada anticuerpo de captura (almacenado a 4 °C), específico para cada virus, se preparó realizando una dilución 1:200 con buffer de carbonatos (Anexo 1) (se recomienda hacer la dilución en tubos de ensayo tratados con ácido sulfúrico)
- En cada pozo de la microplaca (cada placa contiene 96 pozos) se colocaron 75 µl del anticuerpo diluido 1:200
- Se cubrió la placa con kleen-pack y se incubó a 4 °C toda la noche (es posible incubar durante 4 h en cámara húmeda, a temperatura ambiente)
- Transcurrida la incubación del anticuerpo de captura, se lavó la placa con buffer PBST 1X (buffer de lavado) (Anexo 1), para ello, se llenó cada pozo con buffer y se incubó por 1 min, con un movimiento rápido se eliminó el exceso de buffer. Se repitió el lavado dos veces más (sin incubar por 1 min)

b) Preparación de las muestras.

- Cada muestra (de aproximadamente 300 mg), ya fuera de plántula *in vitro* o de planta de invernadero, se colocó en una bolsa de plástico estéril y se le adicionó entre 1.5 a 2 ml de buffer GEB 1X (buffer de extracción) (Anexo 1)
- Con ayuda de un pistilo se maceró el tejido
- Se colectó el volumen de la solución resultante en un tubo eppendorf estéril y se incubó en hielo hasta su uso

c) Incubación de las muestras.

- Se colocaron 100 µl de cada muestra, considerando para cada uno de los virus que se deseaba detectar:
  - 100 µl de blanco (buffer GEB 1X) → **B**
  - 75 µl del control positivo diluido 1:4 (almacenado a -20°C) → **C+**
  - 100 µl de control negativo (extracto de plantas ya evaluadas y negativas para los 4 virus) → **C-**
- Blancos y controles se distribuyeron de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>B</b>											
B	<b>B</b>											
C	<b>C-</b>											
D	<b>C-</b>											
E	<b>C-</b>											
F	<b>C+</b>											
G	<b>C+</b>											
H												

**Figura 7.** Distribución de blancos y controles en la microplaca de ELISA

- Se cubrió la placa con kleen-pack y se incubó por 2 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente
- d) Aplicación del anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina.

- 10 min antes de concluir la incubación, se preparó el segundo anticuerpo específico para cada virus a evaluar (anticuerpo anti-antígeno conjugado con fosfatasa alcalina), utilizando una dilución 1:200 con buffer ECI 1X (buffer de albúmina sérica bovina + PVP) (Anexo 1)

**NOTA IMPORTANTE:** Para el caso de los virus PVA y PVY, hubo una pequeña diferencia, se tenían dos componentes (proporcionados en



tubos diferentes): anticuerpo anti-antígeno y anticuerpo anti-anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, ambos se prepararon utilizando una dilución 1:200 en el mismo tubo.

- Una vez transcurrida la incubación de las muestras se lavó la placa con buffer PBST 1X. En el primer lavado se incubó la placa por 1 min y se repitió (sin incubar) el lavado por lo menos 6 veces más
- Se colocaron 75  $\mu$ l del segundo anticuerpo
- Se cubrió la placa con kleen-pack y se incubó por 2 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente

e) Aplicación del sustrato de revelado.

- Cuando faltaban 10 min para terminar la incubación, se preparó el sustrato PNP (solución de 4-nitrofenil fosfato). Para preparar 10 ml de solución PNP se mezclaron: 2 ml del buffer de sustrato (Anexo 1) + 8 ml de agua desionizada + 2 tabletas de sustrato. Se agitó hasta disolver por completo
- Terminada la incubación, se lavó la placa con buffer PBST 1X por lo menos 7 veces, durante el primer lavado se incubó con buffer por 1 min
- Se agregaron 100  $\mu$ l de la solución PNP en cada pozo
- Se incubó por 60 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente

f) Lectura espectrofotométrica.

- Una vez transcurrido el tiempo, se observó el desarrollo de color y se midió absorbancia con un espectrofotómetro a 405 nm

Las pruebas de ELISA para la detección de virus en plantas de papa, se realizaron en diferentes momentos de la propagación (Figura 4):

- I. Se evaluó la presencia de PVA, PVS, PVY y PVX en una muestra aleatoria de 10 plantas crecidas en condiciones de invernadero (Grupo A).
- II. Se evaluó la presencia de PVA, PVS, PVY y PVX en una muestra aleatoria de 4 plántulas crecidas en condiciones *in vitro*.
- III. Se evaluó la presencia de PVS, en cada uno de los individuos en propagación.
- IV. Se evaluó la presencia de PVA, PVS, PVY y PVX en cada una de las plantas crecidas en condiciones de invernadero, a partir de los tubérculos sometidos a tratamiento fitosanitario preventivo (Grupo B).

## **Eliminación de virus**

### Termoterapia

Se incrementó la temperatura del cuarto de incubación a  $35 \pm 2$  °C, durante 3 semanas. Esta terapia fue aplicada simultáneamente tanto a las plántulas *in vitro* en proceso de propagación, como en los tubérculos brotados del Grupo B (Figura 4).

### Quimioterapia

Se añadieron  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ribavirina (1- $\beta$ -D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida), en los medios de cultivo de proliferación, tuberización y mantenimiento (Cuadro 3), así como en el riego de plantas crecidas en condiciones de invernadero provenientes de tubérculos brotados del Grupo B (Figura 4).

## **Producción de microtubérculos**

Para conocer la tendencia a formar tubérculos de la variedad en estudio y su respuesta a algunas de las condiciones reportadas en la literatura, se realizó un ensayo en el que se probaron dos medios de cultivo para la inducción de microtubérculos. Para la realización de este ensayo se utilizaron 12 tubos de ensayo con las plántulas obtenidas de la siembra de los brotes de tubérculos (Grupo B), con la que se inició la inducción de plantas de papa y la evaluación de los primeros tratamientos de desinfección de explantes (Figura 4). Las plántulas de 6 de estos tubos se individualizaron y se sembraron en medio de cultivo IT<sub>1</sub>, y las plántulas de los otros 6 tubos de ensayo se sembraron de igual manera en el medio de cultivo IT<sub>2</sub>. La composición de estos medios de cultivo se muestran en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Composición de los medios de cultivo empleados en el ensayo de inducción de tuberización (1 L de medio)

	IT <sub>1</sub>	IT <sub>2</sub>
Sales MS	100%	50%
Vitaminas R <sub>2</sub> (Anexo 1)	100%	100%
Glicina	10 ml	10 ml
Sacarosa	80 g	80 g
BA	3 mg	5 mg
Agar Gel	9 g	9 g

Se sembraron entre dos y tres plántulas intactas por frasco, dentro de la campana de flujo laminar y se incubaron manteniéndolas en observación constante. Al cabo de 7 semanas se evaluó el desarrollo de microtubérculos en ambos medios de cultivo.

Una vez establecida la proliferación masiva de plántulas, se optó por sembrar las menos desarrolladas en un medio de cultivo de tuberización similar al empleado en el CIP (Cuadro 3). Las diferencias del medio de cultivo utilizado en este trabajo, con respecto al utilizado en el CIP son que el medio de cultivo del CIP es líquido y que contiene un retardante de crecimiento (cloruro cloro colina).

Se sembraron aproximadamente 10 plántulas por frasco, dentro de la campana de flujo laminar y se incubaron.

Cuando los microtubérculos alcanzaron un peso aproximado de entre 100 y 150 mg, se cosecharon colocándolos en una caja Petri con una solución fungicida de Benlate® (4 g·L<sup>-1</sup>) durante 15 minutos, para posteriormente dejarlos secar en la oscuridad a 20 °C por 2 días. Transcurrido este tiempo los microtubérculos secos se empacaron en bolsas plásticas perforadas y se almacenaron a 5 °C durante 4 a 5 meses en oscuridad.

## RESULTADOS

### **Establecimiento de cultivos *in vitro* de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Fiannas**

Una vez concluido el periodo de cuarentena de los tubérculos-semilla (Grupo B) y después de haberlos sometido a tratamiento fitosanitario durante un mes, se llevó a cabo la desinfección superficial de los tubérculos para su posterior disección y siembra en medio de cultivo de inducción (Cuadro 3).

Se probaron cuatro tratamientos de desinfección (Cuadro 4), en un total de 102 yemas. Los tratamientos de desinfección 1, 2 y 3 se probaron en los tubérculos con brotes del Grupo B, obteniendo un desarrollo de plántulas menor al 50%, debido a un alto porcentaje de contaminación principalmente ocasionada por hongos. A medida que se aplicó el tratamiento subsecuente, la efectividad de los tratamientos (% de plántulas desarrolladas) fue aumentando, ya que fueron incrementado las soluciones desinfectantes y/o el tiempo de exposición del material biológico con las mismas. En el tratamiento 2, por ejemplo, se observó una menor contaminación con respecto al tratamiento 1 debido a la introducción de Vanish<sup>®</sup> en el esquema de desinfección y al incremento en el tiempo de exposición a los agroquímicos Benlate<sup>®</sup> y Agrimycin 500<sup>®</sup>, disminuyendo así la contaminación del 81 al 65%. En el tratamiento 3 se logró disminuir la contaminación al 50% con la intervención de Nistatina, un potente antimicótico de uso clínico.

Para este momento, las plantas crecidas en condiciones de invernadero, procedentes de los tubérculos del Grupo A, contaban ya con dos meses de desarrollo, habiendo alcanzado una altura de 40 a 45 cm aproximadamente y entre 4 y 5 nudos cada rama (Figura 8).

Se cortaron los tallos por debajo del cuarto nudo, para segmentar sus nudos y ápices, someterlos al tratamiento de desinfección 4 (Cuadro 4) y posteriormente diseccionar yemas y establecer con ellas cultivos en medio de inducción (Cuadro 3).



**Figura 8.** Plantas de papa desarrolladas en condiciones de invernadero

Con este nuevo material se logró disminuir la contaminación a un 34%, lo que permitió el desarrollo de un mayor número de plántulas. Todos los cultivos axénicos establecidos durante este periodo del proyecto, se evaluaron ocho días después de la fecha de siembra y los resultados se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Resultados de cultivos de yemas establecidos, después de someterse a los diferentes tratamientos de desinfección

OBSERVACIONES	T R A T A M I E N T O S			
	Grupo B			Grupo A
	1	2	3	4
Número de yemas sembradas	16	17	36	33
Contaminación (%)	81	65	50	34
Plántulas desarrolladas (%)	19	35	50	66

El tratamiento de desinfección más efectivo fue el 4 que mostró una efectividad del 66% (Cuadros 4 y 6), utilizando yemas de plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero. A partir de este punto se utilizaron estas condiciones para llevar a cabo el establecimiento de cultivos asépticos de plantas de papa y a partir de ellos llevar a cabo la propagación a gran escala de este cultivo.

### **Inducción, proliferación y mantenimiento de plántulas de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Fiannas**

Una vez seleccionado el tratamiento de desinfección adecuado, así como el explante idóneo para llevar a cabo el establecimiento de cultivos *in vitro* de plántulas de papa, se sometieron las yemas apicales y axilares provenientes de plantas crecidas en invernadero al tratamiento de desinfección 4 (Cuadro 4).

En el transcurso de 8 semanas, se desinfectaron y cultivaron 368 yemas en medio de inducción, de las cuales 49 yemas fueron apicales y el resto axilares. De las yemas apicales cultivadas 43 sufrieron oxidación, por lo que se tomó la decisión de no continuar utilizando este material para la inducción de cultivos. Además, tampoco se contaba con un número considerable de yemas apicales, ya que durante el crecimiento de las plantas en el invernadero se fueron eliminando las inflorescencias que surgían, pues se requería favorecer el desarrollo foliar (vegetativo).

Al cabo de entre 3 a 4 semanas de incubación se obtuvieron 251 plántulas viables, lo cual reflejó un 68% de sobrevivencia; el resto de las estacas se perdieron, ya fuera por oxidación, por contaminación o por falta de desarrollo (Cuadro 7).

Se realizó el primer subcultivo partiendo de 122 plántulas con un promedio de 2.6 nudos, aunque la población de plántulas desarrolladas fue de 251, muchas de ellas presentaban tallos muy delgados, por lo que se seleccionaron aquellas que tenían mayor probabilidad de desarrollar una plántula vigorosa. Basándonos en la observación de que las plántulas resultantes se habían alargado mucho, se decidió disminuir la concentración de  $AG_3$  en el medio de cultivo de inducción de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Cuadro 3),

logrando así una mejor proporción entre la altura de la plántula, su grosor y el número de nudos que presentaba.

**Cuadro 7.** Resultados de la inducción de yemas y la proliferación de nudos de planta de papa

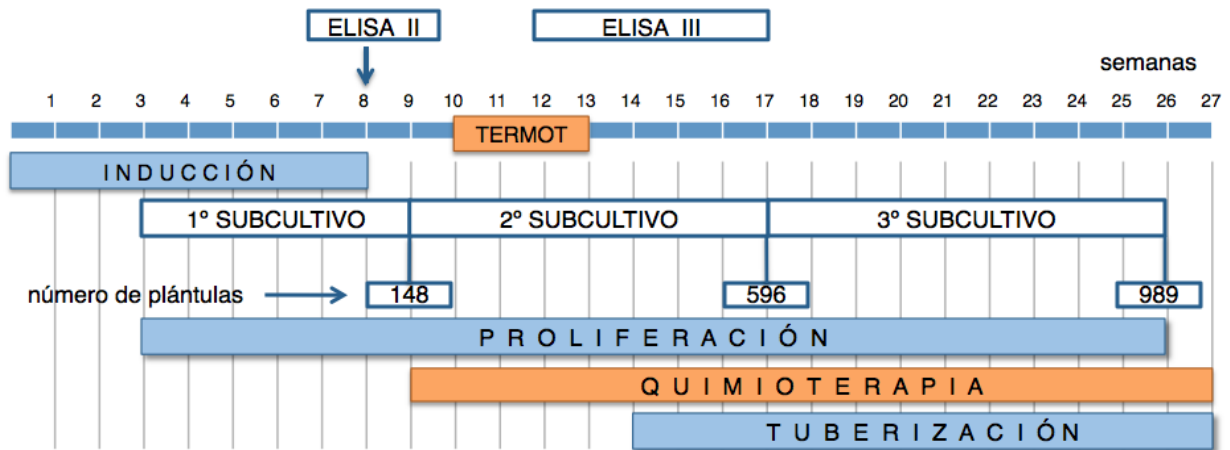
	Tiempo invertido (semanas)	Plántulas de las que se partió	Yemas/Nudos	Plántulas desarrolladas	Sobrevivencia	Subcultivo (semanas)	# de nudos
Inducción	8	-	368	251	68%	3-4	2-3
1° subcultivo	6	122	318	148	47%	5-6	5
2° subcultivo	8	148	691	596	86%	9-12	5
3° subcultivo	9	402	1206	989	82%	-	3

Se subcultivaron 318 nudos en medio de proliferación (Cuadro 3), de los cuales sólo se desarrollaron 148 plántulas, lo cual refleja una tasa del 47% de sobrevivencia debido a la presencia de contaminación en los cultivos principalmente causada por hongos y bacterias (Cuadro 7).

Después de 5 semanas se realizó el segundo subcultivo partiendo de 148 plántulas que en su mayoría presentaban 5 nudos, con lo cual se multiplicó la población a 596 plántulas. Los tiempos de incubación se prolongaron a un promedio de 10 semanas, lográndose un mayor crecimiento de las plántulas y por tanto un aumento en el número de nudos.

Se decidió detener la propagación de plantas durante el tercer subcultivo, pues con ello se alcanzó una población cercana a los mil individuos. Transcurrieron un total de 26 semanas, a partir del momento en que se optó por utilizar como fuente de explante yemas provenientes de las plantas

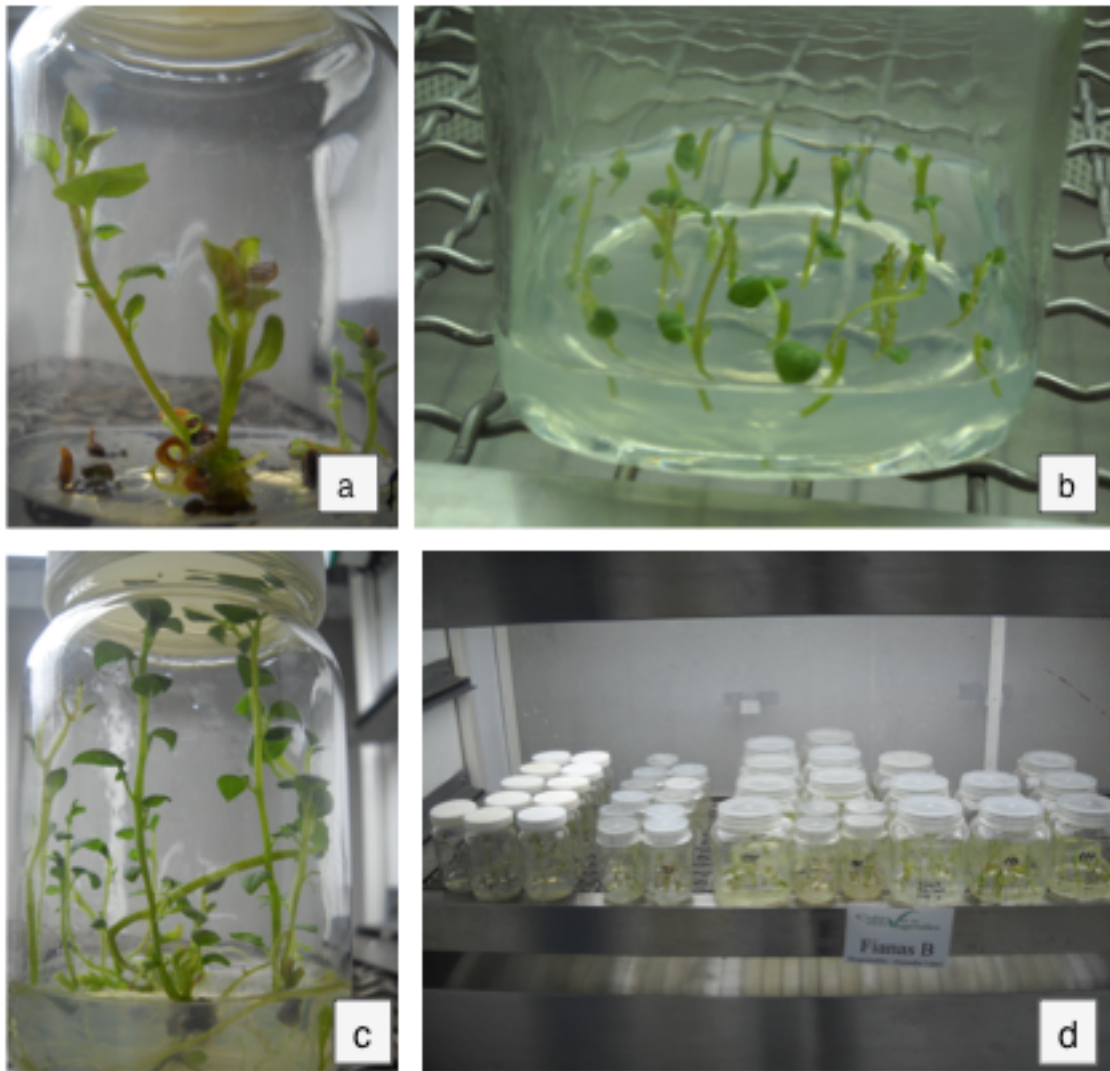
crecidas en condiciones de invernadero, al momento en que se decidió detener la propagación de plántulas de papa (Figura 9 y Figura 10).



**Figura 9.** Cronograma del esquema de micropropagación

Para realizar el cuarto subcultivo se segmentaron las plántulas en nudos individuales, de igual manera que en los subcultivos previos, y se sembraron en medio de mantenimiento. Este medio de cultivo permite disminuir la tasa de crecimiento de las plántulas y extender el intervalo de transferencia a medio de cultivo fresco sin afectar su viabilidad, siempre y cuando se evite su contaminación, para lo cual se adicionó el medio con antiviral, antimicótico y antibiótico.



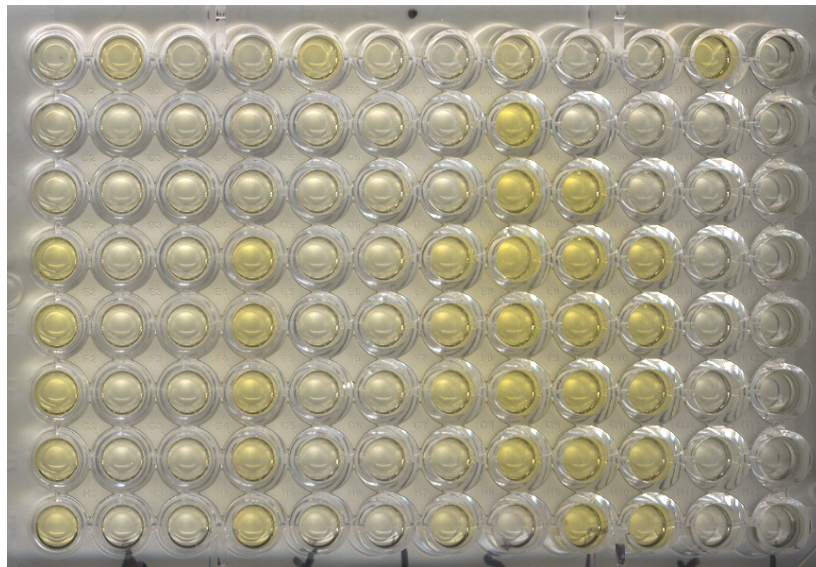


**Figura 10.** Inducción y proliferación de plántulas de papa, variedad Fiannas  
a) Inducción; b) Subcultivo de nudos provenientes de plántulas *in vitro*;  
c) Proliferación; d) Micropropagación

### **Detección de los virus PVA, PVS, PVY y PVX en plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero y en plántulas *in vitro* mediante técnica de ELISA**

Se estableció la técnica de ELISA para evaluar la presencia de los virus X, Y, A y S de papa en diferentes momentos del proyecto (Figura 4 y 9). La intensidad del color desarrollado en las muestras y por tanto la absorbancia reportada, mostró una relación directa con la concentración de antígeno (virus) presente y capturado en el pozo de la microplaca (Figura 11). Para cada corrida de ELISA

fue necesario establecer un valor umbral a partir del cual se discriminaron las muestras positivas de las negativas. Este valor umbral se calculó con los valores de absorbancia del control negativo y a falta de éste, con los del blanco de reactivos. Se realizaron once corridas de pruebas de ELISA, cuyas lecturas de absorbancia y las gráficas que sustentan la interpretación de los datos se muestran en el Anexo 2.



**Figura 11.** Microplaca de ELISA mostrando resultados positivos (pozos amarillos) y negativos (pozos transparentes).

Primeramente se evaluaron diez plantas seleccionadas al azar, crecidas en condiciones de invernadero (Grupo A), el objetivo era conocer el estado fitosanitario original del material biológico del cual se partió, con respecto a estos cuatro virus, además de estandarizar la técnica en el laboratorio. En esta primer corrida, el 100% de la muestra se encontró infectada con PVS y sólo un 20% con PVY y PVX, no se detectaron plantas infectadas con PVA (Cuadro 8).

Para la segunda evaluación se tomaron 4 plántulas al azar crecidas en condiciones *in vitro*, en esta muestra no se detectó la presencia de PVA, PVY ni PVX, mientras que 3 de ellas resultaron positivas para PVS (Cuadro 8). A partir de estos resultados y tomando en cuenta que el material presentaba

principalmente infección con PVS, se decidió enfocar las pruebas sólo a la detección de este virus. Durante las corridas correspondientes a esta evaluación (corridas 2 y 3, Anexo 2), se aprovechó para probar diluciones seriadas del control positivo, esto permitió elegir la dilución 1:4 del control positivo como la más conveniente para realizar las corridas subsecuentes, ya que con esta dilución se obtuvieron valores de absorbancia por arriba del valor umbral, pero sin sobrepasar valores de 2 como ocurrió en la corrida 1, (Anexo 2). (NOTA: Valores de absorbancia superiores a 2 reflejan una desviación a la Ley de Lambert-Beer, en la cual se fundamenta la determinación de la concentración de una sustancia absorbente, a partir del conocimiento de la proporción de intensidad luminosa absorbida. Esta ley sólo se cumple para sustancias diluidas) (Charlote, 1975).

**Cuadro 8.** Resultados de las pruebas de ELISA realizadas a plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero y a plántulas *in vitro* procedentes de tubérculos-semilla del Grupo A

Evaluación	Muestra	Procedencia del material vegetal	PVA +	PVS +	PVY +	PVX +
I	10 (al azar)	Plantas de invernadero	0 %	100%	20 %	20%
II	4 (al azar)	Plántulas <i>in vitro</i>	0%	75%	0%	0%
III	143	Plántulas <i>in vitro</i>	-	29%	-	-

La tercera evaluación consistió en probar todas las plántulas *in vitro* que se encontraban en propagación, éstas corresponden a la población de plántulas de las que se partió para llevar a cabo el segundo subcultivo (Cuadro 7 y Figura 9). Estas plántulas sólo fueron evaluadas para PVS, encontrando un 29% de plántulas infectadas con este virus. Si comparamos los resultados de la segunda y tercera evaluación, podemos observar una notable disminución en

el porcentaje de plántulas infectadas con PVS, en esta comparación es importante tomar en cuenta el tamaño de muestra utilizado, ya que en la evaluación II se evaluaron sólo 4 plántulas y en la evaluación III, 143 (Cuadro 8).

Las plántulas que resultaron positivas a PVS fueron eliminadas del programa de micropropagación para garantizar la sanidad de las plantas propagadas, al menos con respecto a este virus, que era el que predominaba de acuerdo a los resultados obtenidos de la segunda evaluación.

Un mes después de haber sembrado en condiciones de invernadero los tubérculos-semilla del Grupo B, cada una de las plantas obtenidas fueron sometidas a pruebas de ELISA (Evaluación IV) para detectar la presencia de PVA, PVS, PVY y PVX (Figura 4). Para llevar a cabo esta evaluación fue necesario realizar 3 corridas (corridas 9, 10 y 11, Anexo 2) y así conocer el estado fitosanitario de la porción del material biológico que fue sometido a tratamiento fitosanitario previo, además de termoterapia y quimioterapia. Se encontró una franca disminución en la presencia de PVS, PVY y PVX, sólo en el caso de PVA las pruebas mostraron un discreto aumento (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Resultados de las pruebas de ELISA realizadas a las plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero obtenidas de tubérculos-semilla del Grupo A y del Grupo B

Evaluación	Muestra	Plantas crecidas en invernadero	PVA +	PVS +	PVY +	PVX +
I	10 (al azar)	Grupo A	0 %	100%	20 %	20%
IV	62	Grupo B	1.6%	3%*	11%	0%

\* 43% dudosas o positivas débiles

### **Eliminación de virus mediante termoterapia y quimioterapia**

El efecto de haber incrementado en 10 °C (de 25 a 35 ± 2 °C) la temperatura del cuarto de incubación en el que se encontraban tanto los tubérculos brotados del Grupo B como el material *in vitro* en plena proliferación (Grupo A), por un periodo de tres semanas (Figura 9), puede apreciarse en los resultados obtenidos con las pruebas de ELISA. El efecto causado por el agente antiviral empleado tanto en el medio de cultivo de propagación (Grupo A), como en el agua de riego de las plantas de invernadero provenientes de los tubérculos del Grupo B, debe evaluarse de manera conjunta con el efecto causado por la termoterapia, ya que ambas terapias fueron aplicadas en la misma población y simultáneamente.

En el caso de las plántulas *in vitro*, si se comparan la evaluación II con la III (Cuadro 8), se observa una disminución de 46 puntos porcentuales en la presencia del virus S de papa en el material probado (en la evaluación III sólo se probó PVS), esto puede atribuirse tanto a la termoterapia como a la quimioterapia aplicada a dicho material. Lamentablemente no se disponía de los *kit* de ELISA al inicio del proyecto, lo cual constituyó una limitante para realizar las evaluaciones en una muestra representativa, a fin de comprobar objetivamente el efecto de las terapias empleadas para la eliminación de virus.

También se observa que los tubérculos-semilla del Grupo B, que fueron expuestos a termoterapia durante tres semanas, y al tratamiento con Ribavirina en el agua de riego mientras desarrollaban plantas en condiciones de invernadero, presentaron una menor contaminación con PVS, PVY y PVX con respecto a las plantas crecidas en condiciones de invernadero provenientes del Grupo A que no fueron sometidas a termoterapia ni a quimioterapia (Cuadro 9). En el caso de PVS, se encontró un porcentaje bajo de plantas (3%) infectadas con este virus, sin embargo 43% de las ellas presentaron títulos muy bajos pero por arriba del valor umbral (Anexo 2), que condujo a considerarlas como "dudosas"; aún considerando este porcentaje de la muestra como positivas débiles, es posible reconocer una disminución franca de la presencia del virus S. No se puede decir lo mismo de PVA, que presentó un discreto aumento en los tubérculos tratados (Grupo B) con respecto a los no tratados (Grupo A), esto puede atribuirse al tamaño de muestra empleado en la evaluación I.

### Producción de microtubérculos

Para realizar el ensayo de inducción de tuberización, se tomaron algunas de las plántulas desarrolladas durante el establecimiento de cultivos de yemas provenientes de tubérculos brotados (Grupo B) y se subcultivó la mitad en medio IT<sub>1</sub> y la otra mitad en el medio IT<sub>2</sub>.

El primer microtubérculo desarrollado se observó al cabo de 3 semanas de haber cultivado las plántulas. Después de 7 semanas los cultivos presentaban varios tubérculos (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Resultados del ensayo de inducción de tuberización

	IT <sub>1</sub>	IT <sub>2</sub>
Número de plántulas evaluadas	11	12
Plántulas que desarrollaron al menos un microtubérculo	7	5

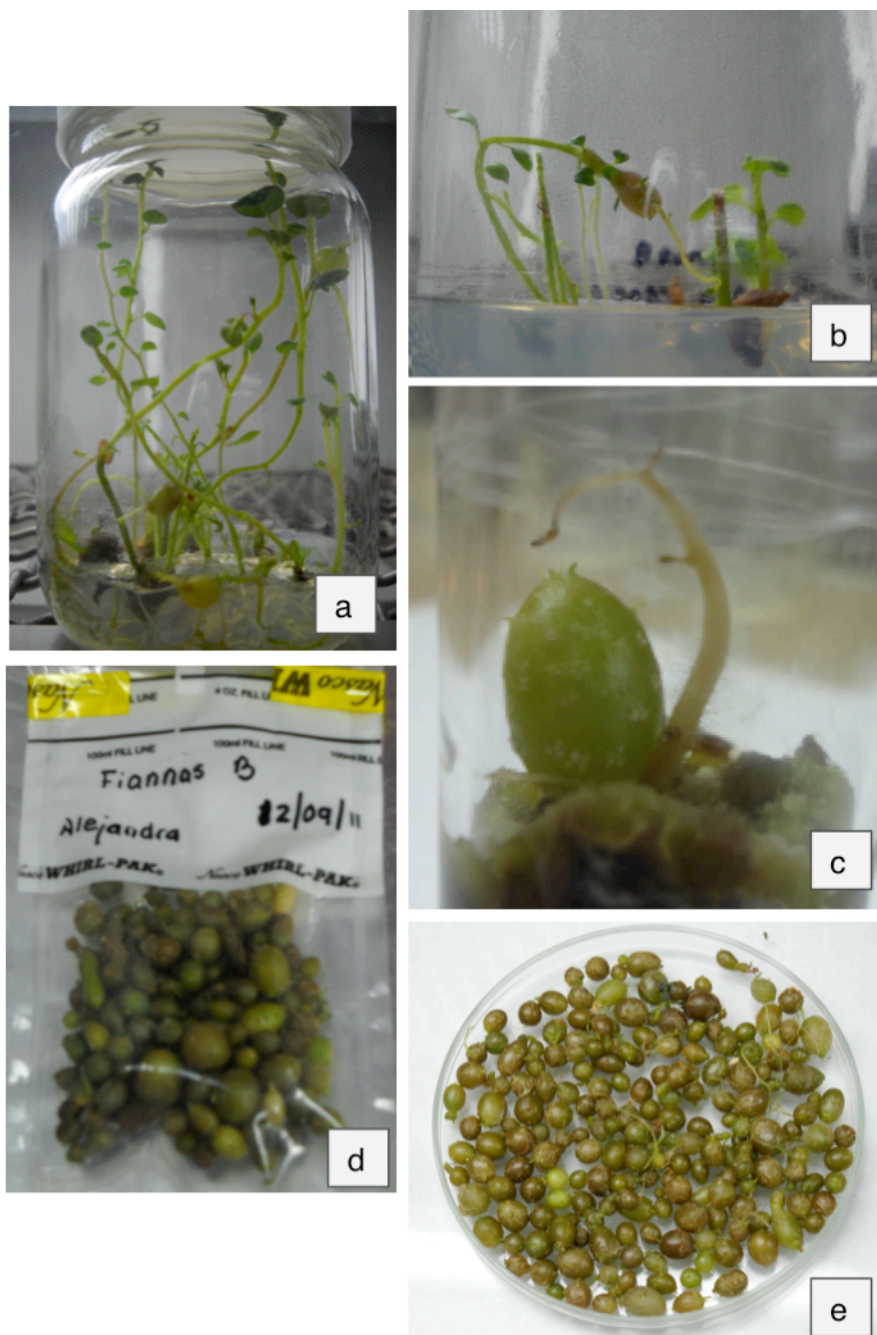
En ambos casos se observó la formación de tubérculos, la diferencia entre los medios de cultivo no fue significativa, por lo cual consideramos que en este caso el medio de cultivo no fue un factor determinante para inducir la tuberización.

Debido a que ya se contaba con una población grande de plántulas en proliferación, se comenzó a seleccionar las plántulas menos robustas que quizá no iban a resultar útiles para propagar y aquellas que comenzaban a desarrollar tubérculos, para sembrarlas en medio de tuberización (Cuadro 3 y Figura 9).

El número de plántulas utilizadas en la producción de microtubérculos, así como el número de microtubérculos obtenidos no fueron registrados cuantitativamente, sin embargo, se observaron características que es importante destacar:

- Los microtubérculos se desarrollaron tanto de forma aérea, como en la base de la plántula partiendo de una estructura similar a estolón y quedando inmersos en el medio de cultivo.
- Los microtubérculos que se desarrollaron al interior del medio de cultivo presentaron mayor talla que los aéreos.
- Las plantas desarrollaron en promedio un microtubérculo.
- Las plántulas que no se transfirieron a medio de tuberización pero se dejaron sin subcultivar a medio de mantenimiento al finalizar la etapa de micropropagación, (Cuadro 7) desarrollaron también microtubérculos, aún cuando las plántulas no continuaron su desarrollo.
- Los microtubérculos cosechados presentaron una amplia variedad de peso fresco, oscilando entre los 50 y 400 mg.
- El tiempo en el que se desarrollaron los microtubérculos fue variable, ya que éstos se obtuvieron tanto en medio de tuberización, como en medio de proliferación, lo cual implica que fueron diferentes factores los que indujeron la formación de tubérculos.

En la Figura 12 se pueden apreciar algunas de las características antes mencionadas. Una vez desarrollados los microtubérculos, se cosecharon y se almacenaron en bolsas plásticas perforadas a 5 °C en la oscuridad.



**Figura 12.** Tuberización *in vitro* de plántulas de papa

a) Desarrollo de tubérculos en la base de la plántula; b) Desarrollo de tubérculos aéreos; c) Desarrollo de tubérculo de plántula sometida a estrés; d) Microtubérculos empacados; e) Cosecha de microtubérculos.



## ANÁLISIS DE RESULTADOS

La selección del explante idóneo, así como la implementación de un tratamiento eficaz para su desinfección, son factores fundamentales para lograr el establecimiento de cultivos *in vitro*. En el presente trabajo, se probaron como posibles fuentes de explantes yemas provenientes de brotes de tubérculo-semilla de papa y yemas obtenidas de plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero.

En los cultivos realizados a partir de yemas de brote de tubérculo se obtuvieron elevados niveles de contaminación, aún habiendo sido tratados previamente con fungicidas y bactericidas, esto se debe a que los tubérculos provenían directamente del campo, donde se encontraban expuestos a diversos agentes contaminantes. En contraste, al utilizar como fuente de explante, yemas obtenidas de plantas de papa a partir del mismo lote de tubérculos-semilla, pero crecidos en condiciones de invernadero, se logró reducir la contaminación a un 34%; esto confirma que la mayor fuente de contaminación primaria en los cultivos *in vitro*, proviene de la planta madre o en este caso, del explante (Cassells, 1997). Durante esta etapa los contaminantes que se presentaron fueron principalmente hongos, coincidiendo con las observaciones de Alvarado que menciona que los contaminantes más frecuentes en el cultivo *in vitro* son hongos filamentosos, bacterias y levaduras; muchos de éstos no provocan daños a las plantas en campo y sin embargo, se convierten en patógenos en condiciones *in vitro* (Pérez-Ponce, 1998).

La implementación de un tratamiento de desinfección basado en la inmersión con agitación en diferentes agentes químicos, permitieron el establecimiento de cultivos asépticos de plantas de papa con una eficacia del 66%. El tratamiento seleccionado consistió en el uso de etanol al 70% (v/v) durante un minuto, éste disminuye la tensión superficial penetrando fácilmente entre las pilosidades foliares y desnaturalizando las proteínas plasmáticas de microorganismos, lo que le confiere propiedades germicidas. El tratamiento continuó con Vanish® (2 g·L<sup>-1</sup>) durante 15 minutos, este producto de uso doméstico contiene peróxido de hidrógeno, el cual es un agente oxidante que al ceder oxígeno, inactiva ciertas proteínas enzimáticas presentes en los

microorganismos. La exposición a una solución de ketoconazol ( $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) más 3 gotas de Tritón 100 durante 20 minutos, limita el crecimiento de hongos, ya que los azoles interrumpen la síntesis del ergosterol en la membrana celular, provocando la acumulación de esteroides intermediarios tóxicos que hacen más permeable la membrana (Gregorí, 2005), el Tritón 100 abate la tensión superficial, facilitando la penetración del antimicótico. Posteriormente, el hipoclorito de sodio comercial ( $\text{NaClO}_2$  20% v/v), más 2 gotas de Tritón 100 y Microdyn<sup>®</sup> ( $10 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 10 minutos, elimina bacterias y virus por ser también un oxidante fuerte, la plata coloidal presente en Microdyn<sup>®</sup> reacciona con los compuestos de azufre de las enzimas localizadas en la membrana, esto conlleva a la pérdida de su permeabilidad, imposibilitando procesos de respiración bacteriana (Morones, 2009). El uso de Benlate<sup>®</sup> ( $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 20 minutos tiene un efecto fungicida a nivel sistémico; ya que benomil el principio activo de este agroquímico, se une selectivamente a los microtúbulos fúngicos, interfiriendo en actividades celulares como la mitosis (<http://benomyl.com>). Por último se utilizó Agrimycin 500<sup>®</sup> ( $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 20 minutos, que es una formulación en la cual la estreptomina, oxitetraciclina y el sulfato tribásico de cobre actúan con un efecto sinérgico, controlando eficazmente las enfermedades fúngicas y bacterianas; como actúa también en forma sistémica, se obtiene una protección interna y externa del explante.

Aunado a este intenso tratamiento de desinfección, se incorporaron en el medio de cultivo, cefotaxima ( $325 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) un antibiótico semisintético de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de mucopéptidos en la pared celular bacteriana, haciéndola defectuosa y osmóticamente inestable y nistatina ( $600,000 \text{ UI}\cdot\text{L}^{-1}$ ), antimicótico con propiedades fungistáticas y fungicidas que se une a esteroides de la membrana celular fúngica, formando canales iónicos y alterando la permeabilidad de su membrana ([www.vademecum.es](http://www.vademecum.es)). La intención de utilizar dichos agentes fue la de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos que pudieran haber permanecido en la superficie del inóculo, o que se hubieran introducido durante la siembra.

De las yemas de plantas de papa utilizadas como explantes, únicamente las yemas axilares desarrollaron brotes, de las yemas apicales no se obtuvo respuesta pues se oxidaron fácilmente, lo cual concuerda con lo reportado por

Valle-Sandoval *et al.* (2008) en un trabajo de regeneración de crisantemo en el que establece que existe un gradiente de etapas de desarrollo en el tallo, lo que determina que sea crítico seleccionar la etapa más adecuada para asegurar un alto porcentaje de regeneración.

La inducción de plántulas de papa se llevó a cabo en un medio de cultivo compuesto por sales MS (Murashige y Skoog) (Anexo 1), esta fórmula ha sido probada por varios investigadores en el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. De acuerdo a lo publicado por Mejía-Muñoz *et al.* (2006) sobre sus investigaciones de propagación *in vitro* de papa ratona, las altas concentraciones de iones potasio, amonio y de l-inositol presentes en la fórmula MS, favorecen la supervivencia y tasa de desarrollo del inóculo, lo cual es decisivo para el cultivo de meristemos apicales de papa y su desarrollo en plántulas vigorosas. A este medio de cultivo se adicionó  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$ , el cual mostró tener un efecto en la ruptura de la dormancia de yemas y en la aceleración del alargamiento de los brotes; observación que coincide con Sarker y Mustafa (2002) y con el CIP *training manual*, quienes así lo reportan con diferentes variedades de papa. No se utilizaron auxinas ni citocininas en los medios de cultivo de inducción ni de proliferación; en cuanto a las auxinas, algunos investigadores como Jiménez *et al.* (2009), Sarker y Mustafa (2002) y Gómez *et al.* (1997), coinciden en que en varios cultivares éstas no son requeridas para el desarrollo morfogénico del explante. Sin embargo, en el caso de las citocininas, aún en su ausencia se obtuvo un promedio de 2 a 3 brotes en el transcurso de 3 semanas, lo cual se contrapone con los resultados de Badoni y Chauhan (2009), Mejía-Muñoz *et al.* (2006), Yousef *et al.* (1997), entre otros, quienes sostienen que la presencia de citocininas es indispensable para lograr una regeneración eficiente y de esta manera obtener un mayor número de plantas por explante. Esto podría por un lado apoyar el hecho de que la respuesta morfogénica puede variar de un genotipo a otro y por otro lado, confirmar que el desarrollo *in vitro* no sólo se encuentra moderado por la interacción de los reguladores de crecimiento proporcionados en el medio de cultivo, sino que también las hormonas endógenas presentes en el explante, juegan un papel determinante (Pérez-Ponce, 1998; Sathyanarayana y Varghese, 2007).

Se llevó a cabo la proliferación de plántulas de papa mediante subcultivos secuenciales de segmentos nodales, al cabo de 3 subcultivos se obtuvo una población cercana a los mil individuos (Figura 9); de haberse llevado a cabo un cuarto subcultivo del total de los propágulos (Cuadro 7) se hubiera alcanzado una producción de aproximadamente 5,000 plántulas de 3 nudos, lo cual podría representar una producción interesante si se utilizara con fines comerciales. Aún cuando la tasa de sobrevivencia de las plántulas en las distintas etapas de propagación tan solo alcanzó un 86% (Cuadro 7), el medio de cultivo empleado fue satisfactorio para garantizar una brotación y multiplicación aceptable, alcanzando una tasa de multiplicación de 8 brotes por explante.

El mantenimiento de plántulas de papa se logró alterando las condiciones óptimas de cultivo, para ello, el medio de cultivo original compuesto por sales MS fue adicionado con sacarosa ( $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sorbitol ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y solidificado con una elevada concentración de agargel ( $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El incremento de azúcares en el medio, en este caso la sacarosa y el sorbitol, no sólo actúan como fuente de carbohidratos sino como reguladores osmóticos, al descender el potencial osmótico del medio, la adsorción celular de agua y nutrientes disminuye, lo cual abate a su vez la tasa de división celular y por tanto el metabolismo de la planta. La sacarosa por sí misma, por ser altamente asimilable puede actuar como agente osmótico en concentraciones elevadas, sin embargo, la presencia de sorbitol en el medio de cultivo interactúa con el contenido de sacarosa, haciendo más efectiva la limitación del crecimiento (García-Águila *et al.*, 2007). El decremento del potencial osmótico es frecuentemente utilizado para reducir la tasa de crecimiento de los cultivos y de esta manera preservar los genotipos en condiciones *in vitro*; en el caso de papa Gopal *et al.* (2002), reportan que la combinación sacarosa/sorbitol,  $20/40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , proporciona la supervivencia máxima (55%) de las microplantas. Aunado a esto, una mayor concentración de gelificante compromete el agua disponible en el medio de cultivo, restringiendo aún más el suministro de agua a la célula vegetal. El crecimiento celular se reanuda al transferir los propágulos a un medio de cultivo con concentraciones normales de azúcar y gelificante (George *et al.*, 2008).

La técnica de ELISA ha sido utilizada para la detección de patógenos en plantas desde los años 60, actualmente se cuenta con *kits* comerciales que

permiten realizarla de manera sencilla, rápida y confiable. Sin embargo, un aspecto que requiere particular atención es el análisis e interpretación de datos.

A partir de los valores de absorbancia de los controles negativos se estableció el valor umbral mediante el cual fue posible discriminar entre las muestras positivas de las negativas. Para interpretar los datos obtenidos en las corridas de ELISA, se tomaron en consideración los lineamientos propuestos por Gillet *et al*, (1986), un grupo de investigadores preocupados por definir los criterios para otorgar un significado objetivo a los resultados arrojados por esta técnica. Éstos son:

1. Establecer claramente el valor umbral utilizado, los criterios más comunes para determinarlo son " $2x$ " y " $x + 3s$ " (siendo  $x$  la media del control negativo y  $s$ , su desviación estándar)
2. Evaluar suficientes plantas para familiarizarse con el intervalo de valores negativos (sanos) que se pueden obtener
3. Incluir en cada corrida muestras previamente evaluadas como negativas, a manera de control negativo, de tal manera que se asegure la representación de un amplio intervalo de valores negativos
4. Siempre incluir un control positivo
5. Comparar controles y muestras provenientes de tejidos similares, obtenidos bajo condiciones similares de crecimiento
6. Correr las muestras por duplicado

Además, como apoyo para la interpretación de los resultados, se recurrió a la representación gráfica de los valores de absorbancia obtenidos (Anexo 2).

Se evaluó la presencia de virus A, Y, X y S de papa, en cuatro puntos diferentes a lo largo de la propagación, esto permitió por un lado, al trabajar con plantas crecidas en condiciones de invernadero procedentes de tubérculos del Grupo A, conocer el estado original (con respecto a estos cuatro virus) del material biológico con el que se trabajó, (ELISA I). Posteriormente al evaluar las plantas procedentes de los tubérculos del Grupo B, que fueron sometidos a termoterapia y quimioterapia (ELISA IV), se pudo valorar el efecto que tuvieron ambas terapias en la eliminación de virus, el cual resultó positivo para los tres virus detectados originalmente, PVS, PVY y PVX (Cuadro 9).

Por otro lado, al evaluar las plántulas crecidas en condiciones *in vitro*, se puede apreciar el estado de las mismas con respecto a PVS, antes (ELISA II) y después (ELISA III) de haber recibido termoterapia y quimioterapia (Figura 9), observándose también una disminución en el contenido de este virus (Cuadro 8). Dichos resultados corresponden con los de Naik y Karihaloo (2007) quienes recurren a la combinación de termoterapia, quimioterapia con antivirales y al cultivo de meristemas para incrementar la probabilidad de obtener plantas de papa libres de virus en la región de Asia-Pacífico. Ellos mismos expresan que las principales limitantes del cultivo de meristemas son la dificultad para llevar a cabo su disección, su baja supervivencia y el tiempo prolongado que toman para desarrollar una plántula viable (de cuatro a ocho meses). Para evitar esto recomiendan aplicar termoterapia a la planta madre, seguido del cultivo de nudos de aproximadamente 0.5 cm, cultivados en medio que contenga Ribavirina, lo cual se aproxima bastante a lo efectuado en este trabajo.

Los microtubérculos de papa pueden utilizarse como un componente adicional al método de propagación, además éstos ofrecen la ventaja de poder ser almacenados por periodos más prolongados y manipulados y transportados más fácilmente que las plántulas; en este trabajo se alcanzó la tuberización *in vitro* partiendo de los cultivos de plantas libres de virus obtenidas por micropropagación, usando medio MS, con un incremento en la concentración de sacarosa ( $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), la presencia de BA ( $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y una alta concentración de agargel ( $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

El fenómeno de la tuberización *in vitro* ha sido investigado extensamente, en diversos estudios se evalúa el efecto que provocan los diferentes inductores con respecto al número, peso, y tiempo en que se producen los tubérculos. Yousef *et al.* (1997), reportan que el explante utilizado tiene una influencia en el tiempo en que tardan en formarse los tubérculos, siendo el cultivo de brotes completos el que presenta mayor rapidez, comparado con nudos individuales.

La importancia de la sacarosa ha sido descrita por Wang y Hu, (1982) quienes explican que a altas concentraciones de este carbohidrato se incrementa la osmolaridad del medio, lo cual constituye un estímulo crítico para la formación del tubérculo, repercutiendo directamente en el número de tubérculos producidos. Coria *et al.* (2004) argumentan que el efecto que tiene

la sacarosa en la tuberización, es el de comportarse como un regulador osmótico sobre los niveles endógenos de ácido giberélico, lo cual inhibe la tuberización por privar la participación de la glicoproteína patatina. Lo observado en este trabajo fue que las altas concentraciones de sacarosa sometieron a las plántulas a cierto estrés hídrico, el cual detuvo el crecimiento de la planta y propició el desarrollo del tubérculo.

En lo que respecta al uso de BA, los criterios no se encuentran tan unificados en la literatura, algunos autores como Wang y Hu (1982), Hussain *et al.* (2006), entre otros, defienden que es posible obtener un máximo número de tubérculos mediante el uso de altas concentraciones de esta citocinina ( $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ); sin embargo, otros autores plantean la obtención de mayor número de tubérculos de elevado peso y talla con el uso de bajas concentraciones de BA ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Yousef *et al.*, 1996; Montoya *et al.*, 2008), pero casi todos coinciden en que la producción de microtubérculos de papa *in vitro* tiene un proceso con dependencia varietal para los diferentes inductores (Gopal *et al.*, 1998), de ahí que sea necesario desarrollar protocolos de tuberización específicos para cada variedad. En el caso de este trabajo, los resultados del ensayo de inducción de tuberización, no presentan una diferencia significativa al utilizar 3 ó  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA en el medio de cultivo.

En el CIP se utiliza para la inducción de tuberización cloruro cloro colina (CCC), un retardante de crecimiento involucrado en procesos celulares, de desarrollo y de estrés en plantas. Sin embargo, otras publicaciones reportan que CCC puede ser sustituido por otros inductores como Kinetina, BA o simplemente sacarosa en altas concentraciones (Hussein *et al.*; 2006, Borda *et al.*, 2001).

Tanto en el experimento de inducción de tuberización, como en el medio de cultivo para inducir la tuberización de las plantas micropropagadas, se emplearon altas concentraciones de agar (9  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), con la finalidad de restringir el aporte de humedad y crear estrés en la planta. De acuerdo con las características cualitativas que presentaron los microtubérculos obtenidos y que se muestran en los resultados, los tubérculos que se formaron mediante el hinchamiento del extremo del "estolón" y que permanecieron en contacto, o inmersos en el medio de cultivo, lograron un mayor desarrollo; ésto conduce a

pensar que un medio de cultivo líquido podría resultar más propicio para la obtención de tubérculos de mayor peso y talla, tal vez por el hecho de exponer mayor superficie en contacto con el medio nutritivo. Tanto el manual de procedimientos del CIP, como otras publicaciones reportan el uso de medios líquidos con buenos resultados (Naik y Karihaloo, 2007; Hussein *et al.*, 2006; Borda *et al.*, 2001). Actualmente con el uso de medios de cultivo líquidos, se han desarrollado biorreactores de inmersión temporal que permiten optimizar la producción de microtubérculos, no sólo por la inducción de un mayor número de tubérculos/planta, sino por el incremento del peso y tamaño de los mismos y la reducción de los costos de producción (Montoya *et al.*, 2008; Naik y Karihaloo, 2007; Pérez *et al.*, 2001).

Algunos investigadores recurren también a factores ambientales como fotoperiodo y temperatura para inducir el proceso de tuberización. Hussein *et al.* (2006) por ejemplo, consideran que la incubación bajo condiciones de completa oscuridad es fundamental, ya que la luz promueve la síntesis de ácido giberélico, que como se mencionó anteriormente inhibe la tuberización, mientras que la oscuridad favorece la síntesis de ácido tuberónico, el cual juega un papel importante en la formación del tubérculo. Los resultados muestran que la luz no impidió que se produjera al menos un microtubérculo por plántula sembrada. En condiciones convencionales, la tasa reportada de tubérculos varía dependiendo el tipo de explante, los inductores empleados, las condiciones ambientales y la variedad en cuestión, oscilando entre 0.85 y 3.6 tubérculos por planta o nudo sembrado (Hussein *et al.*, 2006; Borda *et al.*, 2001; Yousef *et al.*, 1997).



## CONCLUSIONES

- Se implementó un tratamiento de desinfección para la esterilización superficial de yemas axilares de plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero, con una eficacia del 66%, mediante la acción de diferentes agentes químicos como etanol, peróxido de hidrógeno, como germicida, Ketoconazol, como antimicótico, hipoclorito de sodio, como bactericida y viricida superficial, Benlate<sup>®</sup>, como fungicida sistémico y Agrimycin 500<sup>®</sup> como bactericida.
- Las yemas axilares de plantas de papa crecidas en condiciones de invernadero, resultaron ser un explante adecuado para el establecimiento de cultivos *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad Fiannas.
- Se logró inducir el crecimiento de yemas axilares de plantas de papa en condiciones *in vitro*, en medio MS suplementado con Ac. Giberélico, Cefotaxima como antibiótico y Nistatina como antimicótico.
- Se consiguió la multiplicación masiva de plantas de papa, mediante subcultivos periódicos del material vegetal establecido en condiciones *in vitro*, con una tasa de multiplicación de 8 brotes por explante, en el transcurso de 26 semanas; así como el mantenimiento de un lote de dichos propágulos.
- Se detectó la presencia de los virus A, S, Y y X de la papa en extractos herbáceos provenientes tanto de plantas crecidas en condiciones de invernadero, como de plántulas crecidas en condiciones *in vitro* mediante la técnica de ELISA, para conocer la sanidad del material vegetal del que se partió y para garantizar la eliminación de virus en los individuos propagados.
- Se llevó a cabo la eliminación de un porcentaje de los virus infectantes de los tubérculos-semilla de papa, mediante termoterapia a 35 °C, y quimioterapia con Ribavirina, tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.
- Se logró el desarrollo de microtubérculos de peso variable en cultivos *in vitro* de papa, en medio MS suplementado con BA y altas concentraciones de sacarosa (8%).

## PERSPECTIVAS

El presente trabajo constituye una evidencia de que el Cultivo de Tejidos Vegetales puede aportar beneficios sustanciales para la producción comercial de papa, ya que se logró realizar la propagación de plantas sanas y el desarrollo de microtubérculos, que pueden ser utilizados como semilla de elevada calidad fitosanitaria. El uso de material sano para iniciar las plantaciones tiene una repercusión directa en el rendimiento de este cultivo.

Es por lo anterior que se recomienda realizar futuros trabajos encaminados a complementar el protocolo establecido:

- Explorar un proceso de aclimatización que garantice una buena tasa de supervivencia de las plantas al ser transferidas a suelo.
- Establecer un programa para el monitoreo de virus contaminantes, a fin de constatar si las técnicas de eliminación de virus son efectivas.
- Evaluar el desempeño de los microtubérculos desarrollados, así como elaborar procedimientos para optimizar su producción e incrementar su calidad.
- Y con un horizonte más amplio, buscar genes efectivos de resistencia a patógenos, para su incorporación en genotipos comercialmente sobresalientes.

Todo esto con la finalidad última de incrementar las cosechas de este alimento, que será fundamental en las estrategias para garantizar la seguridad alimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ardí B. y Gutiérrez R. 1996.** Principales Enfermedades, Nemátodos e Insectos de la Papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 43 p.
- Badoni A. and Chauhan J. 2009.** Effect of Growth Regulators on Meristem-tip Development and *in vitro* Multiplication of Potato Cultivar "Kufri Himalini". Nature and Science. Uttarakhand, India. 7(9): 31-34.
- Borda C., Toledo J., Golmirzaie A. y Roca W. 2001.** Efecto de Inductores de Tuberización y Fotoperiodo sobre la Microtuberización de *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. Centro Internacional de la Papa. 23 p.
- Bouzo C. 2009.** El Cultivo de Papa en Argentina. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Agrarias. Santa Fe, Argentina.
- Cassells AC. 1997.** Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 375 p.
- Charlot G. 1975.** Curso de Química Analítica General, Tomo II Métodos Electroquímicos y Absorciométricos. Cromatografía. Toray-Masson. Barcelona, España. 200 p.
- CIP Training Manual, TISSUE CULTURE**
- Clark M. and Adams A. 1977.** Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of general Virology. Kent, Great Britain. 34, 475-483.
- Conci V. 2004.** Obtención de Plantas Libres de Virus. VIII Capítulo 5. En: Echenique V, Rubinstein C., Mroginski L., Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA. Argentina. 303-312 p.
- CONPAPA. Comité Nacional del Sistema Producto Papa. 2011.** Ficha técnica. [www.conpapa.org.mx/Ficha.html](http://www.conpapa.org.mx/Ficha.html)

- Coria N., Pérez A., Sarquís J., Cantú I., González H. y Gómez M. 2004.** Regeneración de la Planta de Papa (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* a Partir del Estolón. Ciencia UANL. VII(3): 361-370.
- Debergh P.C. and Maene L.J. 1981.** A Scheme for the Commercial Propagation of Ornamental Plants by Tissue Culture. Scientia Horticulturae 14(4): 335-345.
- FAO. 2008.** Año Internacional de la Papa.  
[www.potato2008.org/es/lapapa/index.html](http://www.potato2008.org/es/lapapa/index.html)
- FAOSTAT. 2008.** <http://faostat.fao.org/>
- Fletcher P. and Fletcher J. 2001.** *In vitro* virus elimination in three Andean root crops: oca (*Oxalis tuberosa*), ulluco (*Ullucus tuberosus*), and arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science. 29: 23-27.
- García-Águila L., De Feria M. y Acosta K. 2007.** Aspectos Básicos de la Conservación *in vitro* de Germoplasma Vegetal. Biotecnología vegetal. 7(2): 67-79.
- George E., Hall M. and De Klerk G. 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background. Springer. 3rd edition. Dordrecht, The Netherlands. 508 p.
- Gillett J., Morrissey S., Ramsdell D. and Sutula Ch. 1986.** Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. Plant Disease. 70(8): 722-726.
- Gómez L., Jaramillo E., Jaramillo S. y Hoyos R. 1997.** Regeneración de Plantas de Papa (*Solanum tuberosum* L.) a Partir de Tejido Foliar en las Variedades Diacol Caprio y Parda Pastusa. Revista Papa. 17: 21-25.
- Gopal J., Chamail A. and Sarkar D. 2002.** Slow-Growth *in vitro* Conservation of Potato Germoplasm at Normal Propagation Temperature. Potato Research. 45(2): 203-213.

**Gopal J., Minocha J.L. and Dhaliwal H.S. 1998.** Microtuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports. 17: 794-798.

**Gray S and Banerjee N. 1999.** Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. Microbiology and Molecular Biology Reviews. New York, USA. 63(1): 128-148.

**Gregorí B. 2005.** Estructura y Actividad de los Antifúngicos. Revista Cubana de Farmacología. 39(2)

**Hamdi M., Ceballos E., Ritter E. y Ruíz J. 1998.** Evaluación de la Capacidad de Regeneración en *Solanum tuberosum* L. Investigación Agraria. 13: 1-2.

<http://benomyl.com>

**Hussain I., Chaudhry Z., Muhammad A., Asghar R., Naqvi S.M. and Rashid H. 2006.** Effect of Chlorocholine Chloride, Sucrose and BAP on *in vitro* Tuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Cardinal). Pakistan Journal of Botany. 38(2): 275-282.

**Ishige T., Masahiro O. and Ohashi Y., 1991.** Transformation of Japanese Potato Cultivars with the  $\beta$ -glucuronidase Gene Fused with the Promoter of the Pathogenesis-Related 1a Protein Gene of Tobacco. Plant Science. 73(2): 167-174.

**Jiménez J., Chaparro A. y Blanco J. 2009.** Evaluación de Diferentes Combinaciones Fitohormonales en la Regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a Partir de Explantes Internodales. Revista Colombiana de Biotecnología. XI(2): 66-74.

**Khachatourians G., McHughen A., Scorza R., Nip W. and Hui Y. 2002.** Transgenic Plants and Crops. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 452 p.

**Khan M., Hoque M., Sarker R., and Muehlbach H. 2003.** Detection of Important Plant Viruses in *In vitro* Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Culture. Hamburg, Germany. 13(1): 21-29.

- Klein R. and Livingston C. 1983.** Eradication of Potato Viruses X and S from Potato Shoot-Tip Cultures with Ribavirin. *The American Phytopathological Society*. 73(7): 1049-1050.
- Koubouris G., Maliogka V., Efthimiou K., Katis N. and Vasilakakis M. 2007.** Elimination of *Plum pox virus* through *in vitro* thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. *Journal of General Plant Pathology*. 73(5): 370-373.
- Lizárraga R., Panta A., Jayasinghe U. y Dodds J. 1991.** Cultivo de Tejidos para la Eliminación de Patógenos. Guía de Investigación CIP 3. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 21 p.
- Loyola-Vargas V. and Vázquez-Flota F. 2006.** *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press Inc. 2nd edition, New Jersey, USA. 393 p.
- Luján-Claire L. 1996.** Historia de la Papa. *Revista Papa*. 26 p.
- Mejía-Muñoz J., González-Castillo S., Mora-Aguilar R. y Rodríguez-Pérez J. 2006.** Propagación *in vitro* de Papa Ratona (*Oxalis tuberosa* Mol.). *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. Chapingo, México. 12(2): 231-237 p.
- Montaldo A. 1984.** Cultivo y Mejoramiento de la Papa. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 676 p.
- Montoya N., Castro D., Díaz J. y Ríos D. 2008.** Tuberización *in vitro* de Papa (*Solanum tuberosum* L.), Variedad Diacol Capiro, en Biorreactores de Inmersión Temporal y Evaluación de su Comportamiento en Campo. *Ciencia* 16(3): 288-295.
- Morones R. 2009.** El Uso de la Plata en los Antibióticos del Futuro. *Revista Digital Universitaria* (en línea). 10(10).  
<http://www.revista.unam.mx/vol.10/art69/int69.htm>
- Naik P. and Karihaloo J. 2007.** Micropropagation for production of quality potato seed in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology. New Delhi, India, 2007. 47 p.

- Nasir I., Tabassum B., Latif Z., Javed M., Haider M. and Husnain T. 2010.** Strategies to Control Potato Virus Y Under *in vitro* Conditions. Pakistan Journal of Phytopathology. 22(1): 63-70.
- Naz S., Siddiqui F., Ali A. and Iqbal J. 2009.** Virus Indexation of *in vitro* Regenerated Sugarcane Plants. Pakistan Journal of Botany. 41(4): 1931-1939.
- Ormeño J. y Sepúlveda P. 2005.** Presencia de Diferentes Virus de Pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Especies de Malezas Asociadas al Cultivo. Agricultura Técnica. 65(4): 343-355.
- Palmer C. and Smith O. 1970.** Effect of Kinetin on Tuber Formation on Isolated Stolons of *Solanum tuberosum* L. Cultured *in vitro*. Plant & Cell Physiology. 11(2): 303-314.
- Pérez N., De Feria M., Jiménez E., Capote A., Chávez M. y Quiala E. 2001.** Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la Producción a Gran Escala de Tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y Estudio de su Comportamiento en el Campo. Biotecnología Vegetal. 1: 17-21.
- Pérez-Ponce J. 1998.** Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, Volumen 1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 390 p.
- Purcell A. and Almeida R. 2005.** Insects as Vectors of Disease Agents. Encyclopedia of Plant and Crop Science. Taylor & Francis. California, USA. 5 p.
- Rabbani A., Askari B., Abbasi N., Bhatti M. and Quraishi A. 2001.** Effect of Growth Regulators on *in vitro* Multiplication of Potato. International Journal of Agriculture & Biology. Rawalpindi, Pakistan. 3(2): 181-182.
- Razdan M. K. 2003.** Introduction to Plant Tissue Culture. Science Publishers, Inc. New Hampshire, USA. 377 p.

- Roca W. y Mroginski L. 1991.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 969 p.
- Rosales I. 2002.** Diagnóstico de Enfermedades en Plantas: Uso de Herramientas Moleculares. Fundación para la Innovación Agraria (FIA) e Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). 14 p.
- Rousselle P., Robert Y. et Crosnier J.C. 1996.** La Patata. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, Francia. 611 p.
- Salazar L. 1995.** Los Virus de la Papa y su Control. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 226 p.
- Salazar L. 1997.** Identificación y Control de Enfermedades Virales y Fitoplasmas de la Papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 3 p.
- Sarker R. and Mustafa B. 2002.** Regeneration and *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Two Indigenous Potato Varieties of Bangladesh. Plant Tissue Culture. 12(1): 69-77.
- Sathyanarayana B. and Varghese D. 2007.** Plant Tissue Culture: Practices and New Experimental Protocols. IK International. New Delhi, India. 292 p.
- Sauceda C. 2010.** Dosis de Nitrógeno y Fecha de Siembra en la Modelación del Rendimiento de Papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Norte de Sinaloa. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México. 124 p.
- Snyder G. and Belknap W. 1993.** A Modified Method for Routine *Agrobacterium*-mediated Transformation of *in vitro* Grown Potato Microtubers. Plant Cell Reports. 12: 324-327.
- Stange C. 2006.** Interacción Planta-virus Durante el Proceso Infeccioso. Ciencia e Investigación Agraria. Santiago, Chile. 33(1): 3-21.
- Torres A., Fajardo T., Dusi A., Resende R. and Buso J. 2000.** Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. Horticultura Brasileira, Brasilia. 18(3):192-195.



- Valenzuela V., Redondo E. y Bujanos R. 2003.** Detección de Virus por Serología y Plantas Indicadoras en el Tubérculo-Semilla y Plantas de Cultivo de Meristemas en Papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Alfa. Revista Mexicana de Fitopatología. Ciudad Obregón, México. 21(2): 176-180.
- Valle-Sandoval M., Mascorro-Gallardo J., Gil-Vázquez I. e Iturriaga-de la Fuente G. 2008.** Regeneración Directa *in vitro* del Crisantemo, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, a Partir de Segmentos de Tallo. Publicaciones Uciencia. 24(3): 219-227.
- Vetía N., Alvarado-Capó Y., García L., Bermúdez-Carballoso I. y Leiva-Mora M. 2008.** Aplicación de la Selección *in vitro* en el Mejoramiento Genético de la Papa para la Resistencia al Tizón Temprano. Biotecnología Vegetal. 8(1): 3-14.
- Visser R., Jacobsen E., Hesselting-Meinders A., Schans M., Witholt B. and Feenstra W., 1989.** Transformation of Homozygous Diploid Potato with an *Agrobacterium tumefaciens* Binary Vector System by Adventitious Shoot Regeneration on Leaf and Stem Segments. Plant Molecular Biology. 12(3): 329-337.
- Wang P. and Hu C. 1980.** Regeneration of Virus-Free Plants through *in vitro* Culture. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Taiwan, Republic of China. 18: 61-99.
- Wang P. and Hu C. 1982.** *In vitro* Mass Tuberization and Virus Free Seed Potato Production in Taiwan. American Journal of Potato Research. Taiwan, Republic of China. 59(1): 33-37.
- Weiland C.M., Cantos M., Troncoso A. and Perez-Camacho F. 2004.** Regeneration of Virus-free Plants by *in vitro* Chemotherapy of GFLV (*Grapevine fanleaf virus*) Infected Explants of *Vitis vinifera* L. CV 'Zalema'. Acta Hort. (ISHS) 652:463-466

**www.senasica.gob.mx**

NOM-040-FITO-2002, Requisitos y especificaciones para la producción y movilización nacional de papa comercial (norma oficial mexicana).

NOM-041-FITO-2002, Requisitos y especificaciones fitosanitarios para la producción de material propagativo asexual de papa (norma oficial mexicana).

**www.siap.sagarpa.gob.mx** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción Anual. 2009.

**www.vademecum.es**

**Yasmin S., Nassiruddin K., Begum R. and Talukder S. 2003.** Regeneration and Establishment of Potato Plantlets through Callus Formation with BAP and NAA. Asian Journal of Plant Sciences. 2(12): 936-940.

**Yousef A., Suwwan M., Al-Musa A. and Abu-Qaoud H. 1997.** *In vitro* Culture and Microtuberization of Spunta Potato (*Solanum tuberosum* L.) Agricultural Sciences. 24(2): 173-181.

## ANEXOS

### ANEXO 1. COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES MADRE

SALES DEL MEDIO MS (Murashige y Skoog, 1962)  
Soluciones de macro y microelementos concentradas (100X), para preparar

COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	1L (g)
<b>SOLUCIÓN I: NITRATOS</b>			
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	101.10	190
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80.04	165
<b>SOLUCIÓN II: SULFATOS</b>			
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.49	37
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	169.01	1.69
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.54	0.860
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	0.0025
<b>SOLUCIÓN III: HALÓGENOS</b>			
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	147.02	44
Yoduro de potasio	KI	166.01	0.083
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	237.93	0.0025
<b>SOLUCIÓN IV: FOSFATO, AC. BÓRICO, MOLIBDATO</b>			
Fosfato de potasio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	136.09	17
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.86	0.620
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	241.95	0.025
<b>SOLUCIÓN V: QUELANTES</b>			
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	278.02	2.784
Na <sub>2</sub> EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> Na <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	372.30	3.724

**VITAMINAS**  
Soluciones concentradas (100X), para preparar

<b>COMPUESTO</b>	<b>FÓRMULA</b>	<b>P.M. (g)</b>	<b>250 ml (mg)</b>
<b>VITAMINAS St</b>			
Tiamina-HCl	$C_{12}H_{17}N_4OSCl \cdot HCl$	337.30	10
Glicina	$C_2H_5NO_2$	75.07	50
Ac. Nicotínico	$C_6H_5NO_2$	123.10	12.5
Piridoxina-HCl	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	205.60	12.5
<b>VITAMINAS R<sub>2</sub></b>			
Myoinositol	$C_6H_{12}O_6$	180.20	$2.5 \times 10^3$
Ac. Nicotínico	$C_6H_5NO_2$	123.10	25
Piridoxina-HCl	$C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$	205.60	25
Tiamina-HCl	$C_{12}H_{17}N_4OSCl \cdot HCl$	337.30	50

**FITOHORMONAS Y COMPUESTOS ORGÁNICOS**  
Soluciones concentradas (100X), para preparar

<b>COMPUESTO</b>	<b>FÓRMULA</b>	<b>P.M. (g)</b>	<b>100 ml (mg)</b>
Ácido Giberélico (AG <sub>3</sub> )	$C_{19}H_{22}O_6$	346.40	10
6-Bencilaminopurina (BA)	$C_{12}H_{11}N_5$	225.3	10
Ácido aminoacético (Glicina)	$C_2H_5NO_2$	75.07	20

**COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES BUFFER  
EMPLEADAS EN LAS PRUEBAS DE ELISA**  
Soluciones concentradas (1X), para preparar

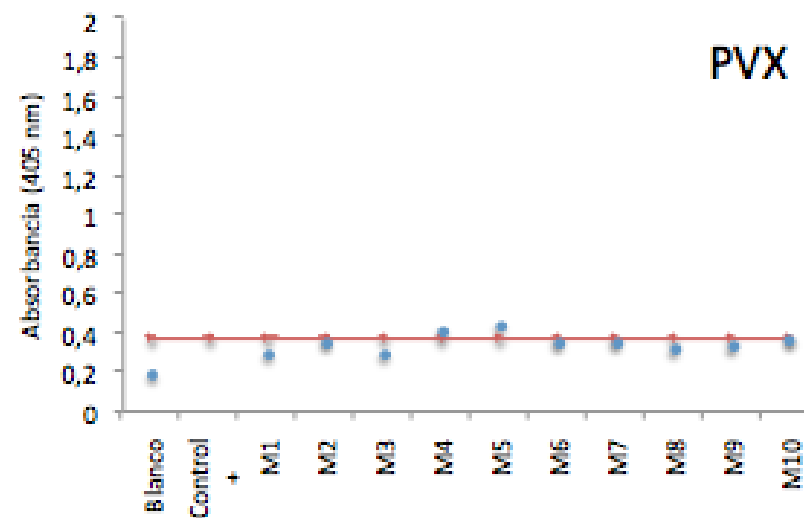
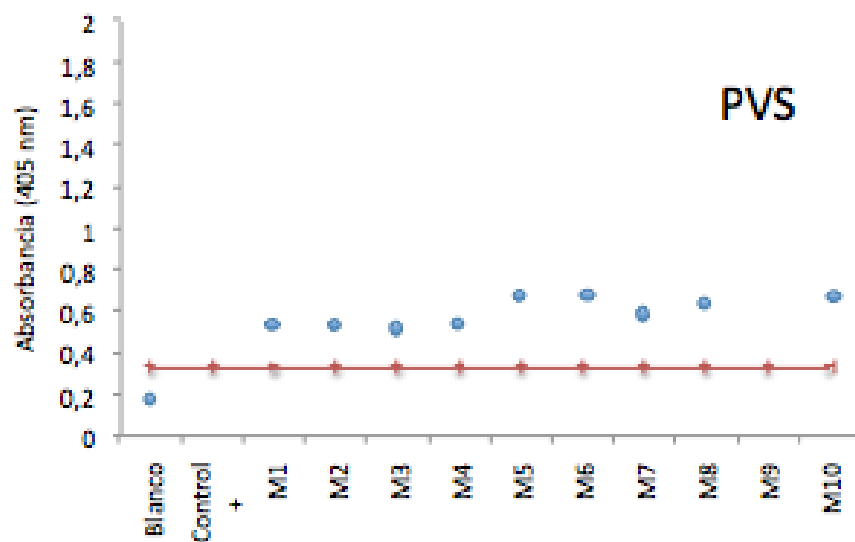
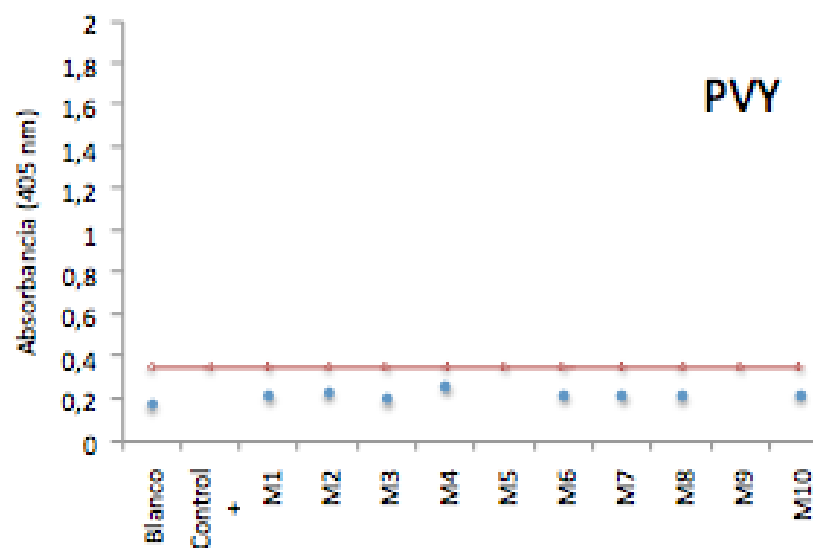
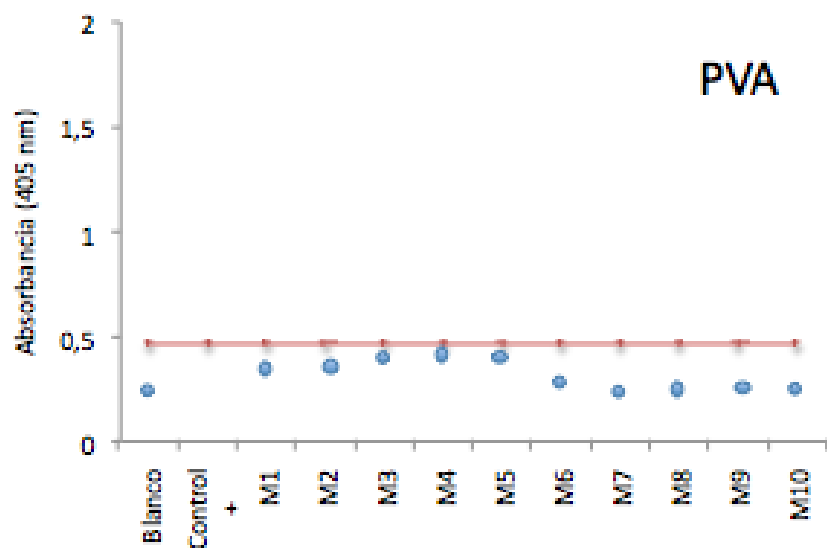
<b>COMPUESTO</b>	<b>1L (g)</b>
<b>BUFFER DE CARBONATOS (captura) pH 9.6</b>	
Carbonato de sodio (anhidro)	1.59
Bicarbonato de sodio	2.93
Azida de sodio	0.2
Disolvente: agua destilada	
<b>BUFFER PBST (lavado) pH 7.4</b>	
Cloruro de sodio	8.0
Fosfato de sodio, dibásico (anhidro)	1.15
Fosfato de potasio, monobásico (anhidro)	0.2
Cloruro de potasio	0.2
Tween 20	0.5
Disolvente: agua destilada	
<b>BUFFER ECL pH 7.4</b>	
Albúmina sérica bovina (BSA)	2.0
Polivinilpirrolidona (PVP)	20
Azida de sodio	0.2
Disolvente: buffer PBST	
<b>BUFFER PNP (sustrato) pH 9.8</b>	
Cloruro de magnesio hexahidratado	0.1
Azida de sodio	0.2
Dietanolamina	97 ml
Disolvente: agua destilada cbp 1L	
<b>BUFFER GEB (extracción) pH 7.4</b>	
Sulfito de sodio anhidro	1.3
Polivinilpirrolidona (PVP)	20.0
Azida de sodio	0.2
Ovoalbúmina	2.0
Tween 20	20.0
Disolvente: agua destilada	

## ANEXO 2. DATOS Y GRÁFICAS DE LAS EVALUACIONES REALIZADAS POR TÉCNICA DE ELISA

Prueba de ELISA realizadas a 10 plantas de invernadero, seleccionadas al azar (PVA, PVY, PVS y PVX)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVA			PVY			PVS			PVX		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.272	0.403	0.286	0.191	<b>3.129</b>	0.298	0.11	<b>0.676</b>	0.716	0.184	<b>0.434</b>	0.391
<b>B</b>	0.192	0.27	0.224	0.164	0.22	0.234	0.215	<b>0.679</b>	0.702	0.185	0.345	0.348
<b>C</b>	2.785	0.226	0.21	2.845	0.217	0.18	3.276	<b>0.587</b>	0.575	3.303	0.347	0.354
<b>D</b>	2.487	0.233	0.199	3.097	0.216	0.225	2.664	<b>0.625</b>	0.851	3.118	0.312	0.346
<b>E</b>	0.33	0.258	0.195	0.217	***	0.2	<b>0.522</b>	<b>3.604</b>	0.748	0.288	0.325	0.41
<b>F</b>	0.358	0.239	0.277	0.232	0.221	0.258	<b>0.534</b>	<b>0.672</b>	0.616	0.347	0.358	0.375
<b>G</b>	0.388	0.195	0.202	0.201	0.178	0.214	<b>0.517</b>	0.623	0.733	0.287	0.424	0.325
<b>H</b>	0.415	0.276	0.274	0.264	0.272	0.261	<b>0.54</b>	0.743	0.745	<b>0.409</b>	0.408	0.395
Blanco (GBE)												
Control +												
Muestras 1-10												
Muestras de otra variedad												
valores en rojo: valores por arriba del valor umbral												
PVA	x=	0.232										
blanco	s=	0.056569										
	2x=	0.464	←	valor umbral								
	x+3s=	0.401706										
PVY	x=	0.1775										
blanco	s=	0.019092										
	2x=	0.355	←	valor umbral								
	x+3s=	0.234776										
PVS	x=	0.1625										
blanco	s=	0.074246										
	2x=	0.325	←	valor umbral								
	x+3s=	0.385239										
PVX	x=	0.1845										
blanco	s=	0.000707										
	2x=	0.369	←	valor umbral								
	x+3s=	0.186621										

Gráfica de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a 10 plantas al azar (PVA, PVY, PVS y PVX)



Pruebas de ELISA realizadas a 4 plántulas *in vitro* seleccionadas al azar (PVY, PVS)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVY						PVS					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.116	1.01	0.498	0.432	0.413	0.193	0.111	0.572	0.156	0.106	0.113	0.252
<b>B</b>	0.105	0.754	0.466	0.403	0.389	0.186	0.107	0.347	0.156	0.103	0.101	0.233
<b>C</b>	0.103	0.736	0.467	0.393	0.415	0.204	0.102	0.34	0.124	0.105	0.102	0.181
<b>D</b>	2.413	0.704	0.437	0.391	0.389	0.205	1.696	0.338	0.125	0.105	0.101	0.164
<b>E</b>	2.233	0.585	0.538	0.417	0.18	0.204	1.673	0.217	0.128	0.105	0.208	0.179
<b>F</b>	2.487	0.587	0.421	0.435	0.202	0.202	1.678	0.224	0.12	0.116	0.213	0.243
<b>G</b>	1.164	0.602	0.442	0.458	0.191	0.193	0.608	0.222	0.117	0.109	0.22	0.241
<b>H</b>	1.228	0.541	0.471	0.505	0.178	0.134	0.619	0.167	0.121	0.13	0.237	0.256

Disposición de los pozos

	PVY						PVS					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco GBE	PVY+1:4	PVY+1:32	PVY+1:256	PVY+1:1024	Muestra 2	Blanco GBE	PVS+1:4	PVS+1:32	PVS+1:256	PVS+1:1024	Muestra 2
<b>B</b>	Blanco GBE	PVY+1:8	PVY+1:32	PVY+1:256	PVY+1:2048	Muestra 2	Blanco GBE	PVS+1:8	PVS+1:32	PVS+1:256	PVS+1:2048	Muestra 2
<b>C</b>	Blanco GBE	PVY+1:8	PVY+1:64	PVY+1:256	PVY+1:2048	Muestra 3	Blanco GBE	PVS+1:8	PVS+1:64	PVS+1:256	PVS+1:2048	Muestra 3
<b>D</b>	PVY+1:2	PVY+1:8	PVY+1:64	PVY+1:512	PVY+1:2048	Muestra 3	PVS+1:2	PVS+1:8	PVS+1:64	PVS+1:512	PVS+1:2048	Muestra 3
<b>E</b>	PVY+1:2	PVY+1:16	PVY+1:64	PVY+1:512	Muestra 1	Muestra 3	PVS+1:2	PVS+1:16	PVS+1:64	PVS+1:512	Muestra 1	Muestra 3
<b>F</b>	PVY+1:2	PVY+1:16	PVY+1:128	PVY+1:512	Muestra 1	Muestra 4	PVS+1:2	PVS+1:16	PVS+1:128	PVS+1:512	Muestra 1	Muestra 4
<b>G</b>	PVY+1:4	PVY+1:16	PVY+1:128	PVY+1:1024	Muestra 1	Muestra 4	PVS+1:4	PVS+1:16	PVS+1:128	PVS+1:1024	Muestra 1	Muestra 4
<b>H</b>	PVY+1:4	PVY+1:32	PVY+1:128	PVY+1:1024	Muestra 2	Muestra 4	PVS+1:4	PVS+1:32	PVS+1:128	PVS+1:1024	Muestra 2	Muestra 4

control + a diferentes diluciones

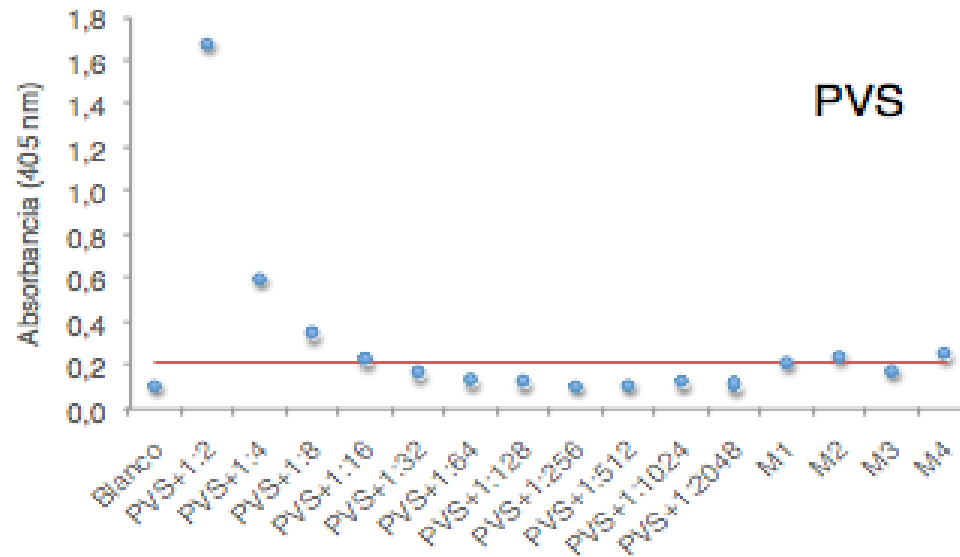
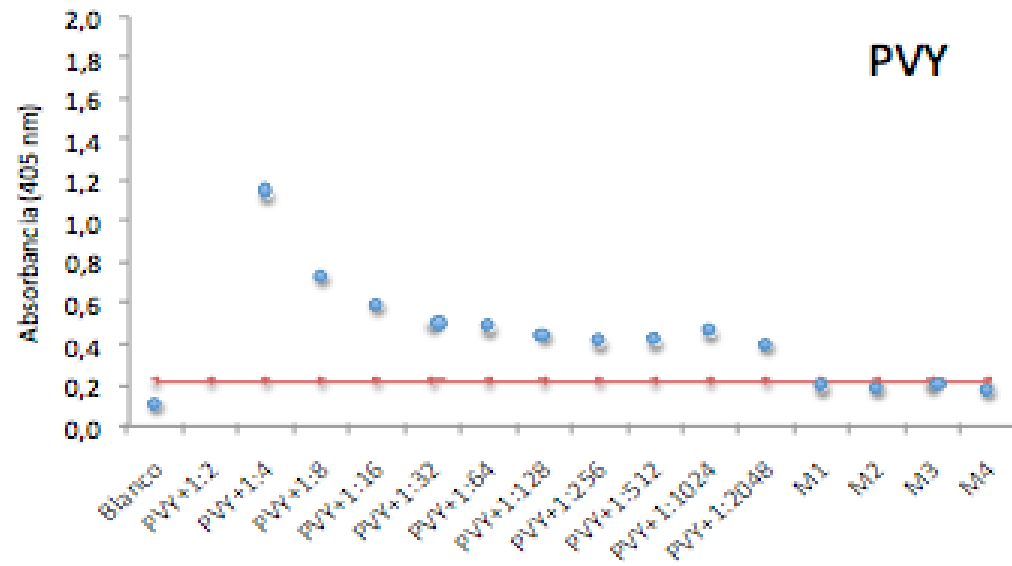
muestras y control + se corrieron por triplicado

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

PVY	x=	0.108		
	s=	0.007		
blanco	2x=	0.216	←	valor umbral
	x+3s=	0.129		
PVS	x=	0.106667		
	s=	0.004509		
blanco	2x=	0.213333	←	valor umbral
	x+3s=	0.120194		



Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a 4 plántulas *in vitro* seleccionadas al azar (PVY, PVS)



Pruebas de ELISA realizadas a 4 plántulas *in vitro* seleccionadas al azar (PVA, PVX)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVA						PVX					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.364	0.788	0.446	0.36	0.347	0.166	0.242	1.173	0.486	0.221	0.207	0.166
<b>B</b>	0.316	0.522	0.409	0.347	0.334	0.16	0.188	0.855	0.449	0.22	0.196	0.158
<b>C</b>	0.32	0.539	0.42	0.338	0.326	0.189	0.222	0.885	0.381	0.229	0.198	0.165
<b>D</b>	1.76	0.511	0.39	0.333	0.326	0.176	2.088	0.844	0.341	0.2	0.191	0.147
<b>E</b>	1.869	0.48	0.432	0.349	0.175	0.193	2.198	0.663	0.396	0.226	0.168	0.172
<b>F</b>	1.82	0.427	0.364	0.372	0.198	0.206	2.11	0.593	0.286	0.253	0.194	0.203
<b>G</b>	0.721	0.464	0.41	0.341	0.167	0.181	1.206	0.624	0.308	0.196	0.16	0.175
<b>H</b>	0.826	0.452	0.437	0.381	0.193	0.206	1.237	0.5	0.337	0.239	0.207	0.249

Disposición de los pozos

	PVA						PVX					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Blanco GBE	PVA+1:4	PVA+1:32	PVA+1:256	PVA+1:1024	Muestra 2	Blanco GBE	PVX+1:4	PVX+1:32	PVX+1:256	PVX+1:1024	Muestra 2
<b>B</b>	Blanco GBE	PVA+1:8	PVA+1:32	PVA+1:256	PVA+1:2048	Muestra 2	Blanco GBE	PVX+1:8	PVX+1:32	PVX+1:256	PVX+1:2048	Muestra 2
<b>C</b>	Blanco GBE	PVA+1:8	PVA+1:64	PVA+1:256	PVA+1:2048	Muestra 3	Blanco GBE	PVX+1:8	PVX+1:64	PVX+1:256	PVX+1:2048	Muestra 3
<b>D</b>	PVA+1:2	PVA+1:8	PVA+1:64	PVA+1:512	PVA+1:2048	Muestra 3	PVX+1:2	PVX+1:8	PVX+1:64	PVX+1:512	PVX+1:2048	Muestra 3
<b>E</b>	PVA+1:2	PVA+1:16	PVA+1:64	PVA+1:512	Muestra 1	Muestra 3	PVX+1:2	PVX+1:16	PVX+1:64	PVX+1:512	Muestra 1	Muestra 3
<b>F</b>	PVA+1:2	PVA+1:16	PVA+1:128	PVA+1:512	Muestra 1	Muestra 4	PVX+1:2	PVX+1:16	PVX+1:128	PVX+1:512	Muestra 1	Muestra 4
<b>G</b>	PVA+1:4	PVA+1:16	PVA+1:128	PVA+1:1024	Muestra 1	Muestra 4	PVX+1:4	PVX+1:16	PVX+1:128	PVX+1:1024	Muestra 1	Muestra 4
<b>H</b>	PVA+1:4	PVA+1:32	PVA+1:128	PVA+1:1024	Muestra 2	Muestra 4	PVX+1:4	PVX+1:32	PVX+1:128	PVX+1:1024	Muestra 2	Muestra 4

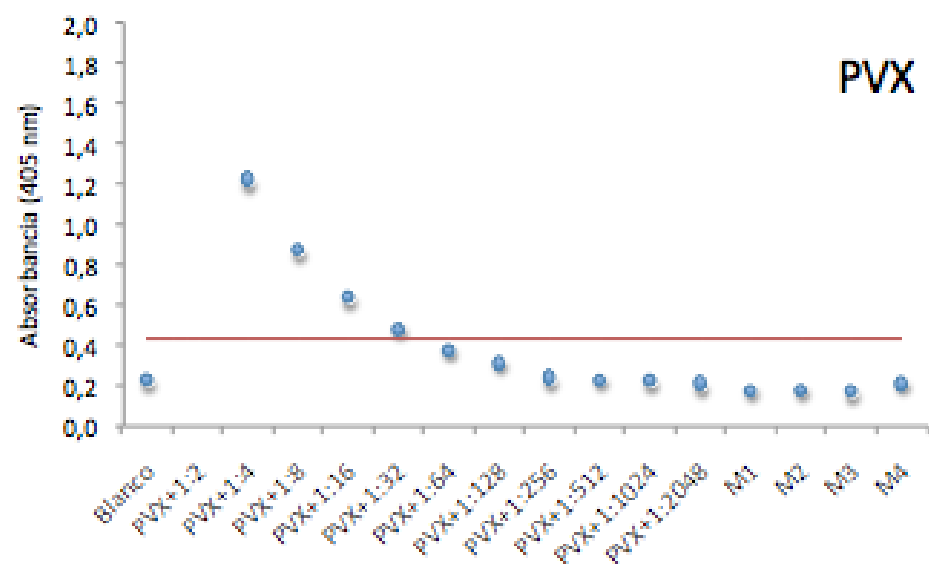
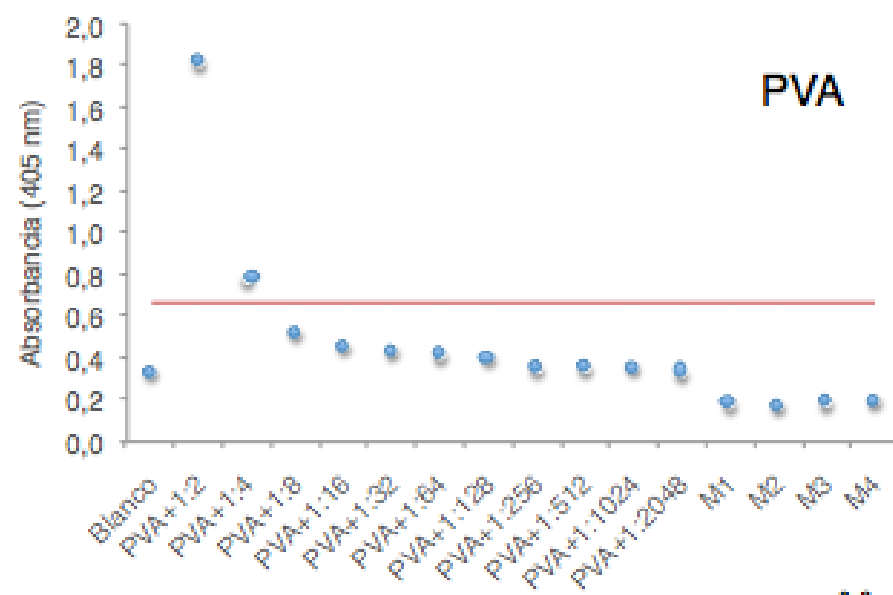
control + a diferentes diluciones

muestras y control + se corrieron por triplicado

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

PVA blanco	x=	0.333333	
	s=	0.026633	
	2x=	0.666667	← valor umbral
	x+3s=	0.413233	
PVX blanco	x=	0.217333	
	s=	0.027301	
	2x=	0.434667	← valor umbral
	x+3s=	0.299236	

Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a 4 plántulas *in vitro* seleccionadas al azar (PVA, PVX)



Pruebas de ELISA realizadas para toda la población de plántulas *in vitro*. Parte I (1-13) (PVS)  
Valores de Absorbancia 405 nm

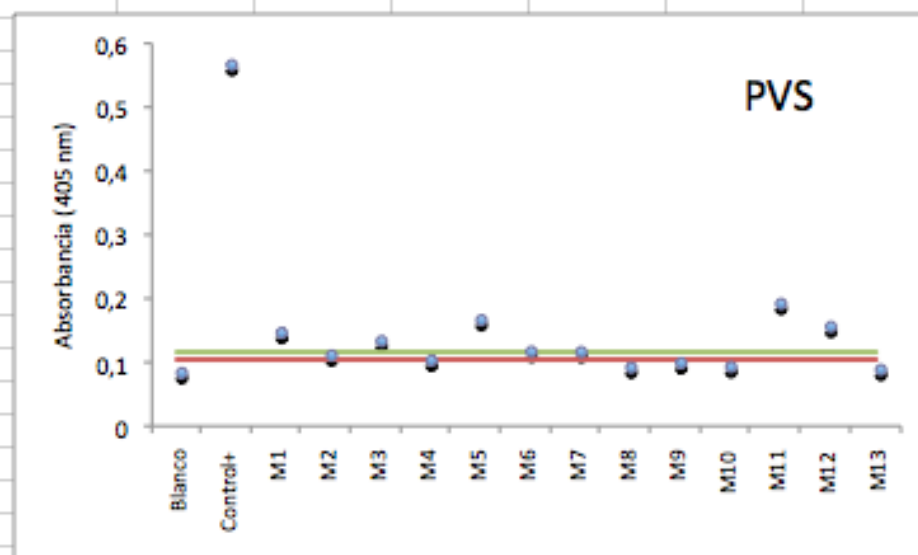
					Disposición de los pozos				
	1	2	3	4		1	2	3	4
A	0.088	0.144	0.113	0.189	A	Blanco GBE	M3	M7	M11
B	0.078	0.122	0.119	0.194	B	Blanco GBE	M3	M7	M11
C	0.568	0.102	0.093	0.162	C	PVS + 1:4	M4	M8	M12
D	0.564	0.103	0.09	0.149	D	PVS + 1:4	M4	M8	M12
E	0.145	0.167	0.098	0.084	E	M1	M5	M9	M13
F	0.147	0.165	0.099	0.092	F	M1	M5	M9	M13
G	0.105	0.109	0.091		G	M2	M6	M10	
H	0.116	0.124	0.094		H	M2	M6	M10	

valores en rojo= valores por encima del valor umbral

PVS	x=	0.083	
	s=	0.007071	
blanco	2x=	0.166	
	x+3s=	0.104213	← valor umbral (0.116)

— Valor umbral calculado

— Valor umbral ajustado



Pruebas de ELISA realizadas a toda la población de plántulas *in vitro*. Parte II (14-53) (PVS)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.112	0.126	0.138	0.191	0.104	0.097	0.108	0.108	0.114	0.125	0.104	0.038
B	0.114	0.132	0.13	0.171	0.099	0.097	0.108	0.111	0.113	0.11	0.107	0.042
C	0.117	0.176	0.113	0.192	0.137	0.12	0.161	0.114	0.115	0.087	0.092	0.043
D	0.111	0.176	0.113	0.192	0.137	0.11	0.195	0.119	0.122	0.098	0.086	0.045
E	0.817	0.171	0.112	0.196	0.126	0.157	0.214	0.151	0.177	0.111	0.043	0.045
F	0.825	0.175	0.11	0.19	0.119	0.148	0.245	0.158	0.176	0.121	0.036	0.043
G	0.135	0.136	0.102	0.121	0.154	0.197	0.139	0.114	0.123	0.133	0.035	0.041
H	0.127	0.134	0.128	0.127	0.157	0.216	0.144	0.13	0.137	0.153	0.035	0.039

Disposición de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M15	M19	M23	M27	M31	M35	M39	M44	M48	M52	
B	Blanco GBE	M15	M19	M23	M27	M31	M35	M39	M44	M48	M52	
C	Blanco GBE	M16	M20	M24	M28	M32	M36	M40	M45	M49	M53	
D	Blanco GBE	M16	M20	M24	M28	M32	M36	M40	M45	M49	M53	
E	PVS + 1:4	M17	M21	M25	M29	M33	M37	M42	M46	M50		
F	PVS + 1:4	M17	M21	M25	M29	M33	M37	M42	M46	M50		
G	M14	M18	M22	M26	M30	M34	M38	M43	M47	M51		
H	M14	M18	M22	M26	M30	M34	M38	M43	M47	M51		

las muestras se corrieron por duplicado

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

PVS	x=	0.1135	
	s=	0.002646	
	2x=	0.227	
blanco	x+3s=	0.121437	← valor umbral (0.15)

Pruebas de ELISA realizadas a la población de plántulas *in vitro*. Parte III (54-68) (PVS)  
Valores de Aborbancia 405 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.091	0.091	0.113	1.02	1.268	0.124	0.119	0.189	0.206			
B	0.087	0.086	0.11	0.964	1.291	0.132	0.121	0.185	0.206			
C	0.117	0.097	1.468	1.734		0.155	0.135	0.154	0.12			
D	0.119	0.096	1.606	1.757	1.581	0.16	0.126	0.152	0.116			
E	0.114	1.624	1.717	0.111	1.51	0.201	0.111	0.256	0.185			
F	0.112	1.516	1.812	0.106	1.56	0.195	0.109	0.256	0.18			
G	0.443	0.231	0.103	0.105	1.137	0.178	0.103	0.134				
H	0.45	0.261	0.112	0.115	1.197	0.185	0.096	0.147				

Disposición de los pozos

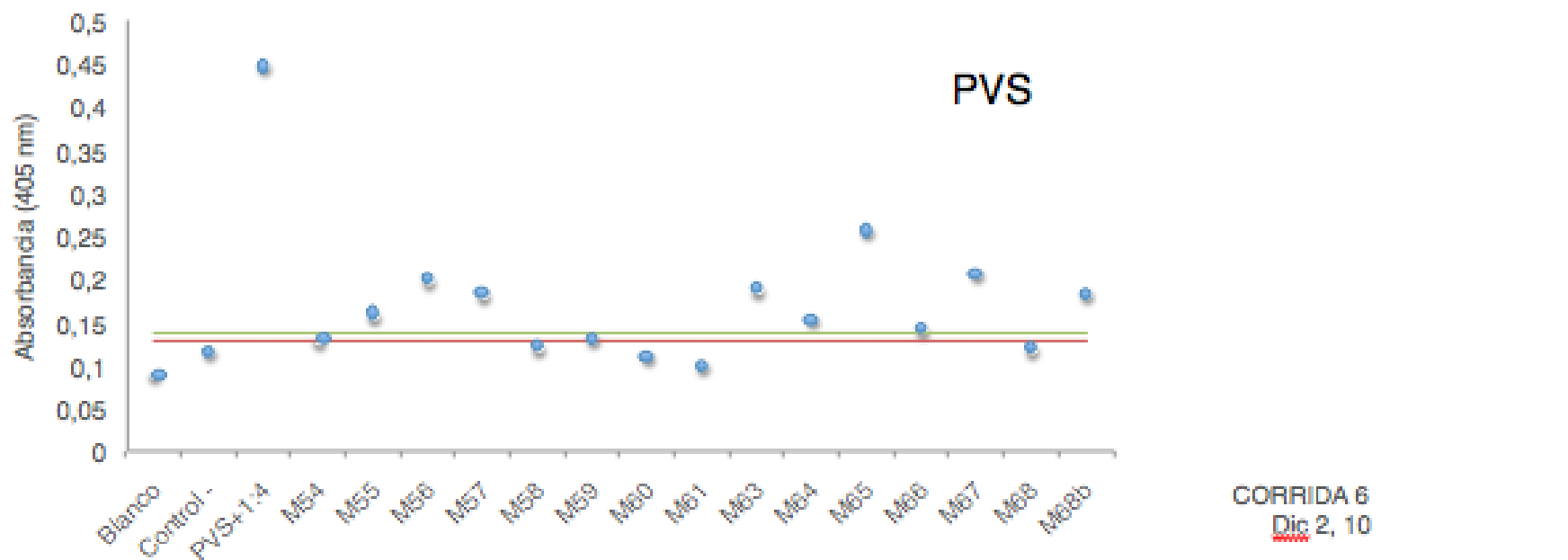
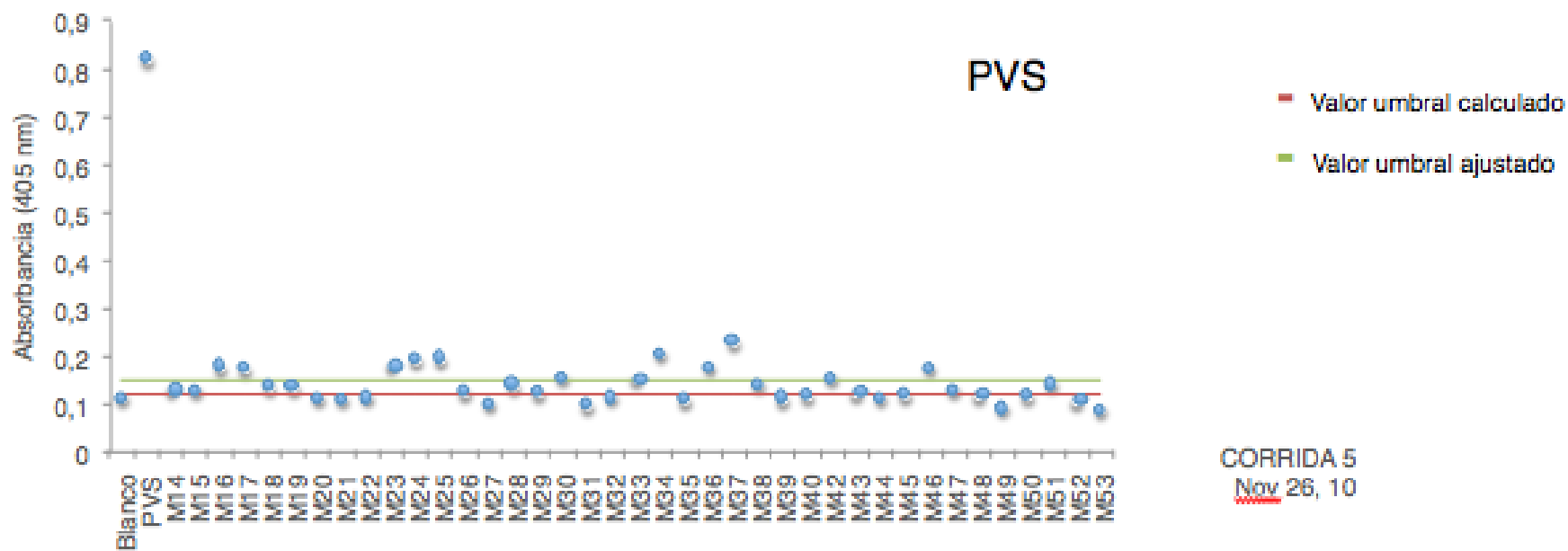
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M	M	M	M	M54	M58	M63	M67			
B	Blanco GBE	M	M	M	M	M54	M58	M63	M67			
C	Control -	M	M	M	M	M55	M59	M64	M68			
D	Control -	M	M	M	M	M55	M59	M64	M68			
E	Control -	M	M	M	M	M56	M60	M65	M68b			
F	Control -	M	M	M	M	M56	M60	M65	M68b			
G	PVS + 1:4	M	M	M	M	M57	M61	M66				
H	PVS + 1:4	M	M	M	M	M57	M61	M66				

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

Muestras de otra variedad

PVS	x=	0.1155
	s=	0.003109
	2x=	0.231
	x+3s=	0.124827
Control -	x+4s=	0.127937 ← valor umbral (0.137)

Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a la población de plántulas *in vitro*. Parte II (14-53) y Parte III (54-68) (PVS)



Pruebas de ELISA realizadas a la población de plántulas *in vitro*. Parte IV (69-149) (PVS)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.124	0.241	0.161	0.152	0.168	0.146	0.166	0.193	0.279	0.278	0.237	0.158
B	0.127	0.167	0.151	0.175	0.145	0.141	0.176	0.3	0.251	0.208	0.122	0.182
C	0.122	0.185	0.21	0.151	0.199	0.186	0.188	0.297	0.273	0.204	0.69	0.161
D	1.103	0.149	0.144	0.159	0.166	0.195	0.244	0.274	0.274	0.226	1.775	0.132
E	0.573	0.188	0.219	0.138	0.214	0.198	0.176	0.284	0.277	0.138	0.464	0.182
F	0.254	0.154	0.162	0.173	0.145	0.145	0.22	0.21	0.248	0.172	0.734	0.124
G	0.156	0.14	0.146	0.154	0.189	0.151	0.147	0.241	0.265	0.103	0.083	0.225
H	0.209	0.14	0.197	0.289	0.147	0.172	0.282	0.179	0.247	0.229	0.891	0.083

Disposición de los pozos

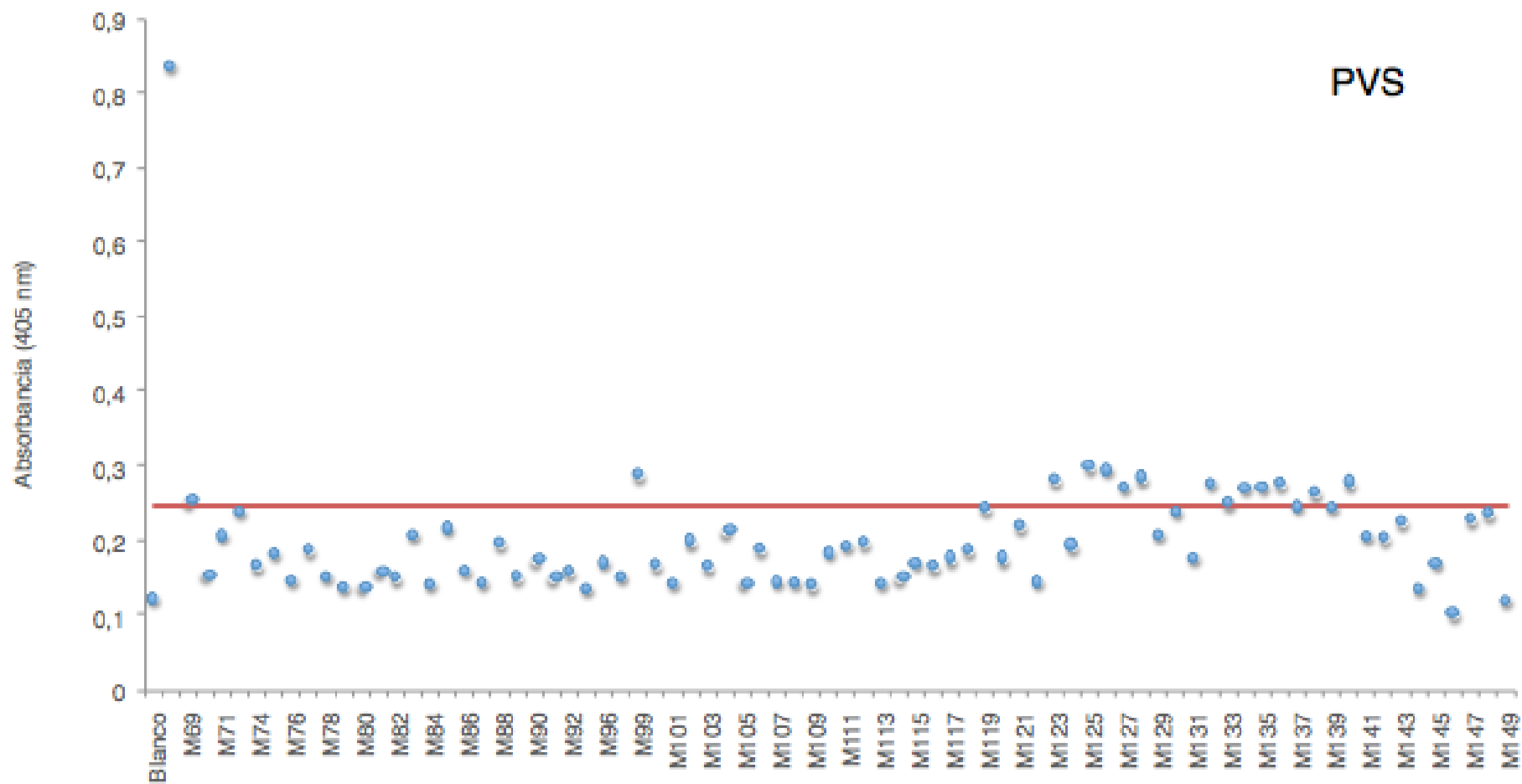
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M73	M81	M89	M100	M108	M116	M124	M132	M140	M148	MM
B	Blanco GBE	M74	M82	M90	M101	M109	M117	M125	M133	M141	M149	MM
C	Blanco GBE	M75	M83	M91	M102	M110	M118	M126	M134	M142	MM	MM
D	PVS + 1:4	M76	M84	M92	M103	M111	M119	M127	M135	M143	MM	MM
E	PVS + 1:4	M77	M85	M93	M104	M112	M120	M128	M136	M144	MM	MM
F	M69	M78	M86	M96	M105	M113	M121	M129	M137	M145	MM	MM
G	M70	M79	M87	M98	M106	M114	M122	M130	M138	M146	MM	MM
H	M71	M80	M88	M99	M107	M115	M123	M131	M139	M147	MM	MM

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

Muestras de otra variedad												
PVS	x=	0.124333										
	s=	0.002517										
blanco	x+5s=	0.136916										
	2x=	0.248667	←	valor umbral								



Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a la población de plántulas *in vitro*, Parte IV (69-149) (PVS)



CORRIDA 7  
Febrero 9, 11

Pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte I (1-16) (PVA, PVY, PVS y PVX)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVA			PVY			PVS			PVX		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.215	0.129	0.126	0.172	0.135	0.127	0.116	0.15	0.14	0.251	0.139	0.129
B	0.175	0.098	0.095	0.143	0.11	1.904	0.091	0.132	0.143	0.238	0.154	0.153
C	0.1	0.096	0.089	0.126	0.104	0.101	0.117	0.144	0.151	0.182	0.125	0.123
D	0.106	0.094	0.089	0.115	0.098	0.098	0.119	0.142	0.14	0.185	0.13	0.114
E	0.132	0.103	0.086	0.11	0.109	0.083	0.104	0.126	0.122	0.17	0.117	0.117
F	0.099	0.1	0.079	0.102	0.908	0.092	0.109	0.138	0.153	0.192	0.116	0.129
G	0.54	0.081	0.087	0.475	1.605	0.088	0.289	0.131	0.139	1.333	0.102	0.115
H	0.543	0.099	0.088	0.489	0.105	0.105	0.291	0.133	0.147	1.275	0.124	0.134

Disposición de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M1	M9	Blanco GBE	M1	M9	Blanco GBE	M1	M9	Blanco GBE	M1	M9
B	Blanco GBE	M2	M10	Blanco GBE	M2	M10	Blanco GBE	M2	M10	Blanco GBE	M2	M10
C	Control -	M3	M11	Control -	M3	M11	Control -	M3	M11	Control -	M3	M11
D	Control -	M4	M12	Control -	M4	M12	Control -	M4	M12	Control -	M4	M12
E	Control -	M5	M13	Control -	M5	M13	Control -	M5	M13	Control -	M5	M13
F	Control -	M6	M14	Control -	M6	M14	Control -	M6	M14	Control -	M6	M14
G	PVA + 1:4	M7	M15	PVY + 1:4	M7	M15	PVS + 1:4	M7	M15	PVX + 1:4	M7	M15
H	PVA + 1:4	M8	M16	PVY + 1:4	M8	M16	PVS + 1:4	M8	M16	PVX + 1:4	M8	M16

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

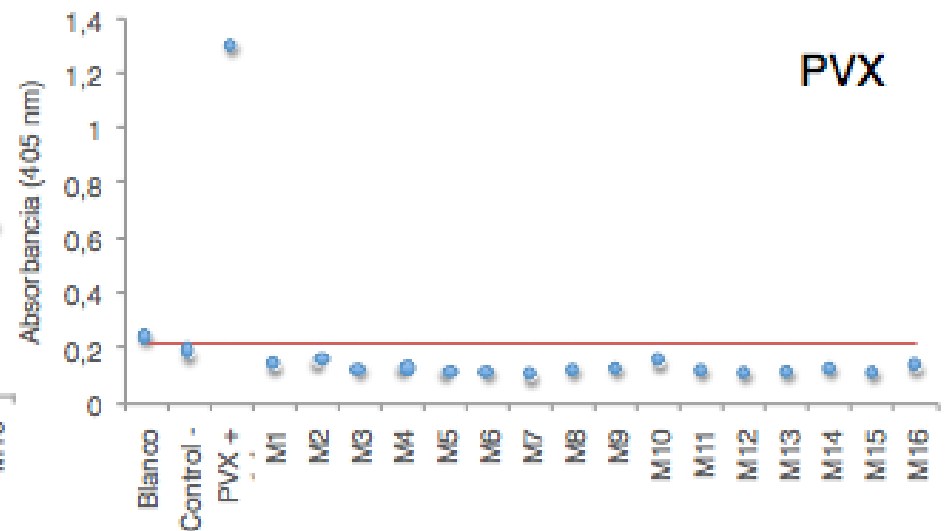
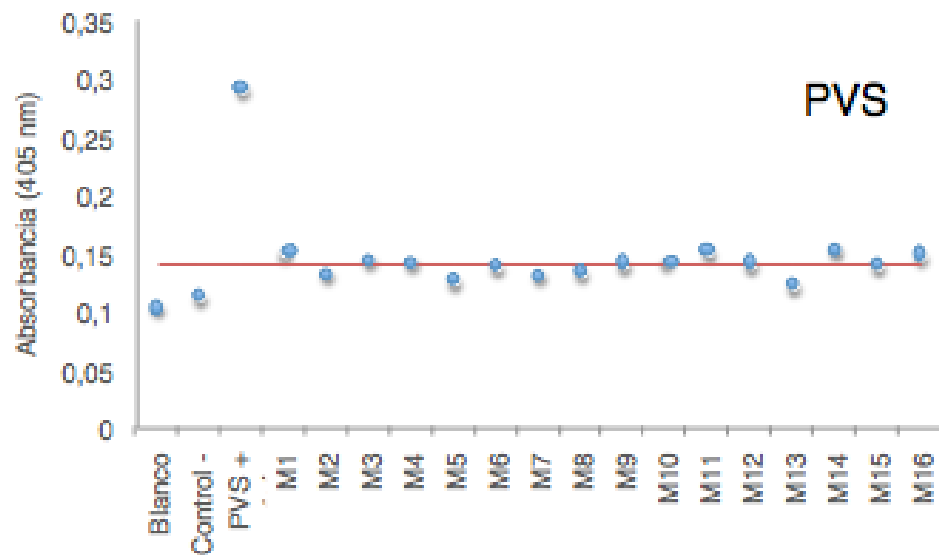
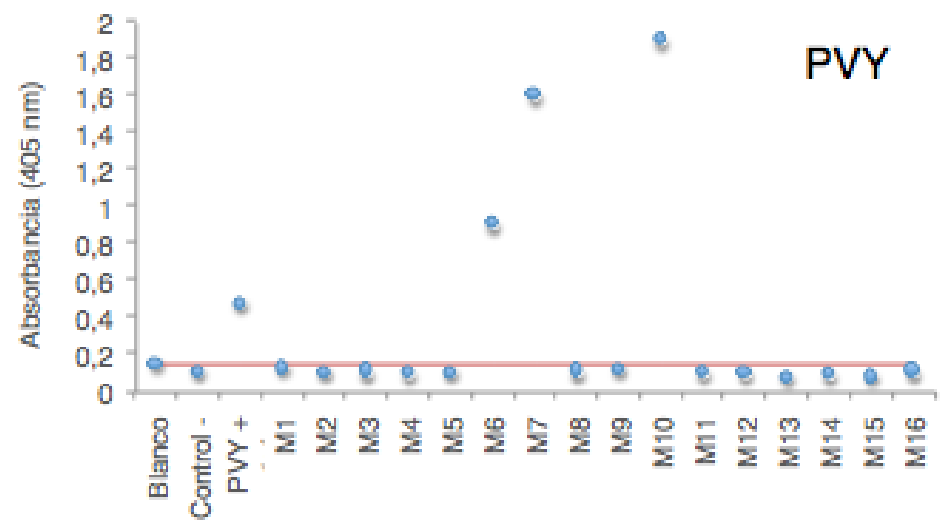
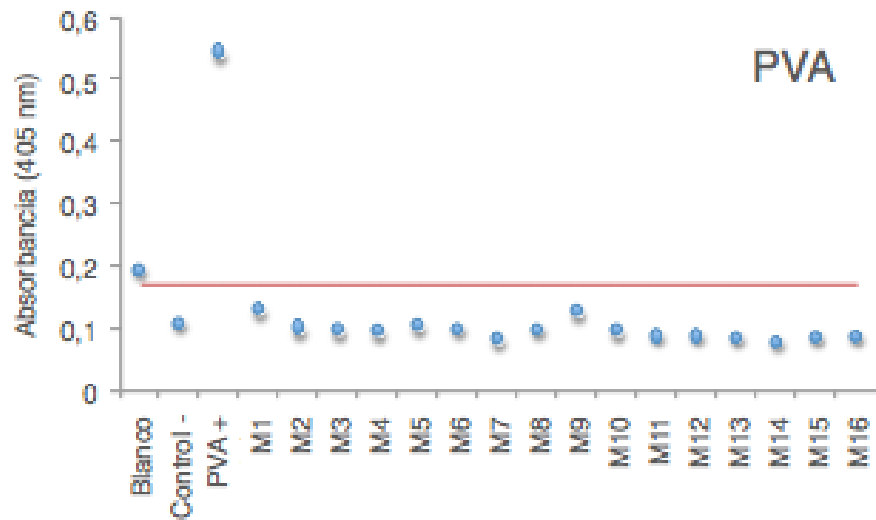
PVA	x=	0.10925	
	s=	0.015478	
control -	x+4s=	0.171164	← valor umbral

PVS	x=	0.11225	
	s=	0.006994	
control -	x+4s=	0.140226	← valor umbral (0.15)

PVY	x=	0.11325	
	s=	0.010046	
control -	x+4s=	0.153433	← valor umbral

PVX	x=	0.18225	
	s=	0.009179	
control -	x+4s=	0.218965	← valor umbral

Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte I (1-16) (PVA, PVY, PVS y PVX)



Pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte II (17-32) (PVA, PVY, PVS y PVX)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVA			PVY			PVS			PVX		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.142	0.099	0.105	0.178	0.111	0.127	0.079	0.133	0.107	0.167	0.106	0.129
B	0.191	0.086	0.082	0.198	0.103	0.104	0.079	0.132	0.155	0.176	0.096	0.099
C	0.128	0.078	0.082	0.139	0.1	0.087	0.089	0.129	0.13	0.141	0.102	0.097
D	0.135	0.085	0.085	0.141	2.407	0.095	0.088	0.131	0.135	0.158	0.11	0.098
E	0.134	0.097	0.093	0.152	0.093	0.097	0.097	0.121	0.13	0.163	0.106	0.104
F	0.128	0.094	0.1	0.139	0.108	0.104	0.1	0.13	0.147	0.17	0.108	0.144
G	0.467	0.103	0.092	0.51	0.114	0.101	0.276	0.141	0.145	0.836	0.111	0.12
H	0.469	0.106	0.112	0.545	0.109	0.107	0.269	0.134	0.138	0.848	0.103	0.14

Disposición de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M17	M25	Blanco GBE	M17	M25	Blanco GBE	M17	M25	Blanco GBE	M17	M25
B	Blanco GBE	M18	M26	Blanco GBE	M18	M26	Blanco GBE	M18	M26	Blanco GBE	M18	M26
C	Control -	M19	M27	Control -	M19	M27	Control -	M19	M27	Control -	M19	M27
D	Control -	M20	M28	Control -	M20	M28	Control -	M20	M28	Control -	M20	M28
E	Control -	M21	M29	Control -	M21	M29	Control -	M21	M29	Control -	M21	M29
F	Control -	M22	M30	Control -	M22	M30	Control -	M22	M30	Control -	M22	M30
G	PVA + 1:4	M23	M31	PVY + 1:4	M23	M31	PVS + 1:4	M23	M31	PVX + 1:4	M23	M31
H	PVA + 1:4	M24	M32	PVY + 1:4	M24	M32	PVS + 1:4	M24	M32	PVX + 1:4	M24	M32

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

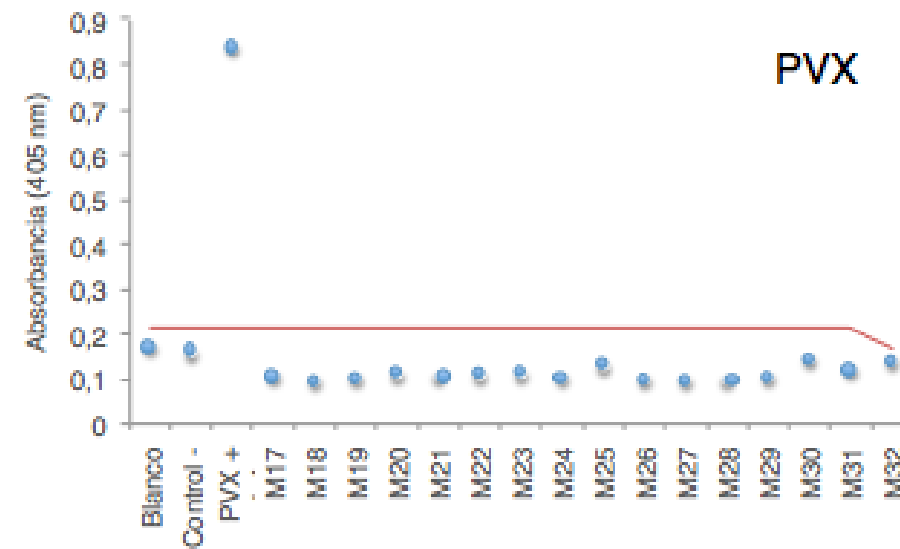
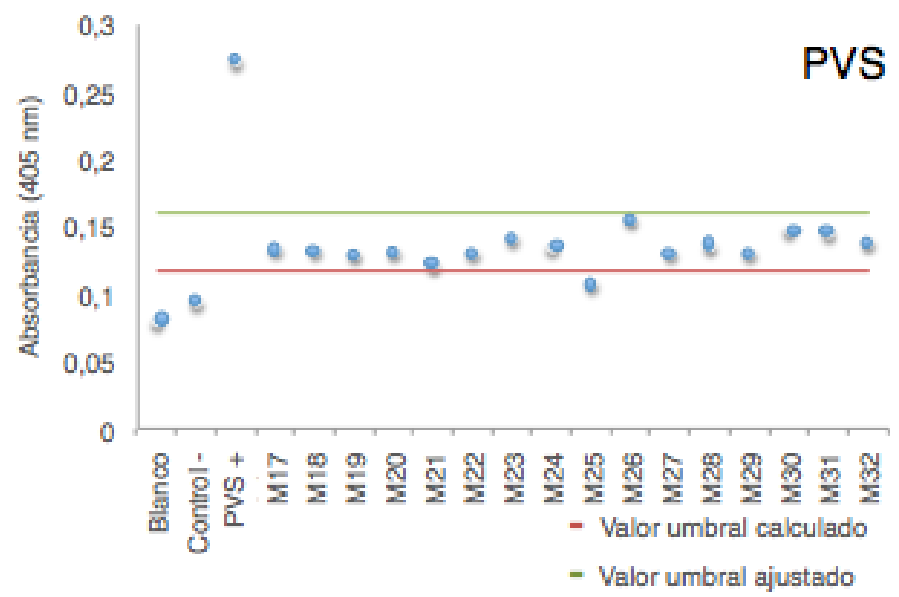
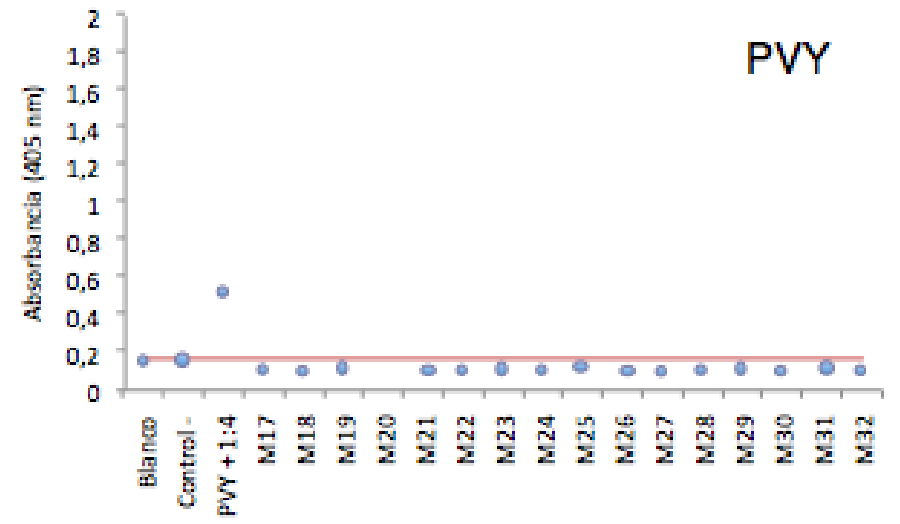
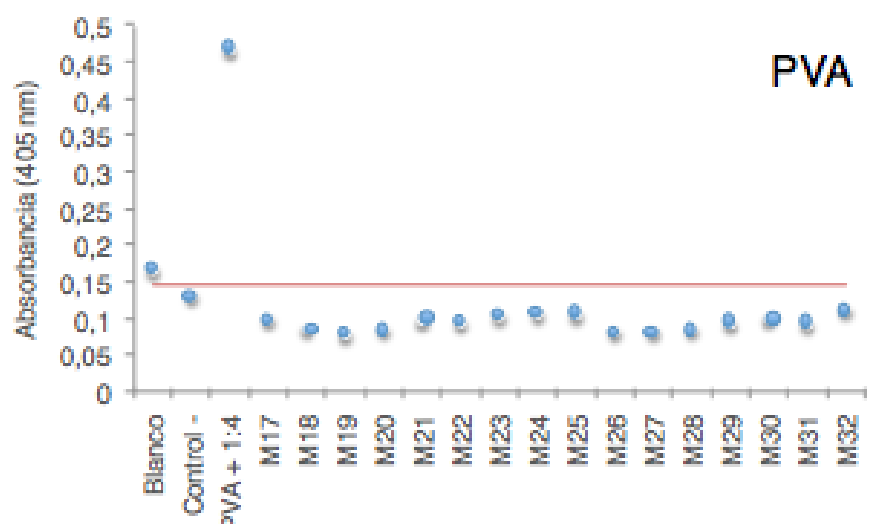
PVA	x=	0.13125	
	s=	0.003775	
control -	x+4s=	0.14635	← valor umbral

PVS	x=	0.0935	
	s=	0.005916	
control -	x+4s=	0.117164	← valor umbral (0.16)

PVY	x=	0.14275	
	s=	0.006238	
control -	x+4s=	0.167703	← valor umbral

PVX	x=	0.158	
	s=	0.012356	
control -	x+4s=	0.207423	← valor umbral

Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte II (17-32) (PVA, PVY, PVA y PVX)



Pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte III (33-46) (PVA, PVY, PVS y PVX)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVA			PVY			PVS			PVX		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.144	0.139	0.164	0.235	0.26	0.243	0.11	0.207	0.201	0.092	0.125	0.129
B	0.12	0.121	0.128	0.215	0.216	0.157	0.153	0.199	0.194	0.101	0.115	0.116
C	0.135	0.154	0.124	0.292	0.302	0.227	0.178	0.21	0.196	0.11	0.136	0.132
D	0.132	0.139	0.124	0.288	0.292	0.244	0.178	0.238	0.208	0.104	0.134	0.123
E	0.118	0.108	0.124	0.297	0.212	0.179	0.175	0.198	0.196	0.097	0.121	0.124
F	0.126	0.12	0.117	0.276	0.206	0.184	0.175	0.197	0.19	0.107	0.129	0.13
G	0.744	0.101	0.125	1.474	0.196	0.176	0.62	0.179	0.18	0.758	0.091	0.098
H	0.75	0.283	0.117	1.416	0.295	0.186	0.644	0.188	0.196	0.798	0.123	0.113

Disposición de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M38	M39	Blanco GBE	M40	M39	Blanco GBE	M41	M39	Blanco GBE	M42	M39
B	Blanco GBE	M40	M40	Blanco GBE	M41	M40	Blanco GBE	M42	M40	Blanco GBE	M43	M40
C	Control -	M33	M41	Control -	M33	M41	Control -	M33	M41	Control -	M33	M41
D	Control -	M34	M42	Control -	M34	M42	Control -	M34	M42	Control -	M34	M42
E	Control -	M35	M43	Control -	M35	M43	Control -	M35	M43	Control -	M35	M43
F	Control -	M36	M44	Control -	M36	M44	Control -	M36	M44	Control -	M36	M44
G	PVA + 1:4	M37	M45	PVY + 1:4	M37	M45	PVS + 1:4	M37	M45	PVX + 1:4	M37	M45
H	PVA + 1:4	M38	M46	PVY + 1:4	M38	M46	PVS + 1:4	M38	M46	PVX + 1:4	M38	M46

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

Muestras de otra variedad

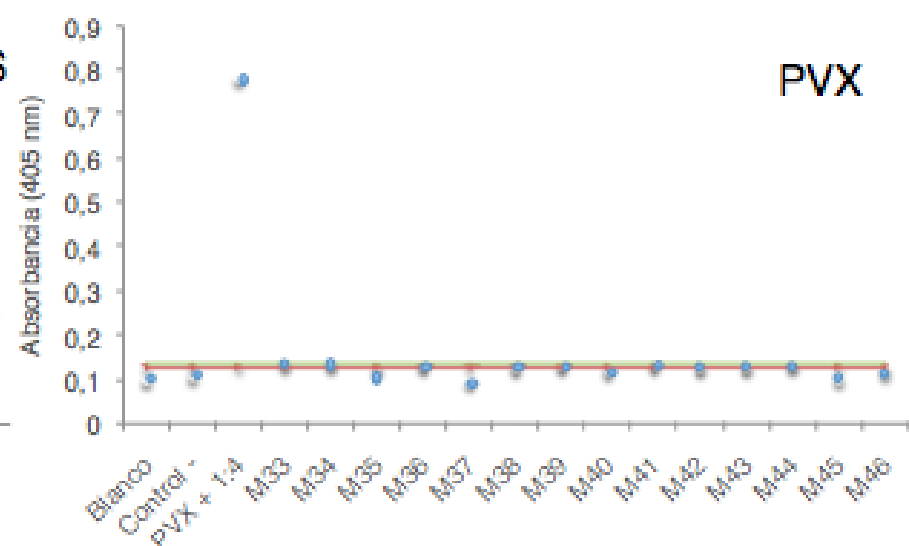
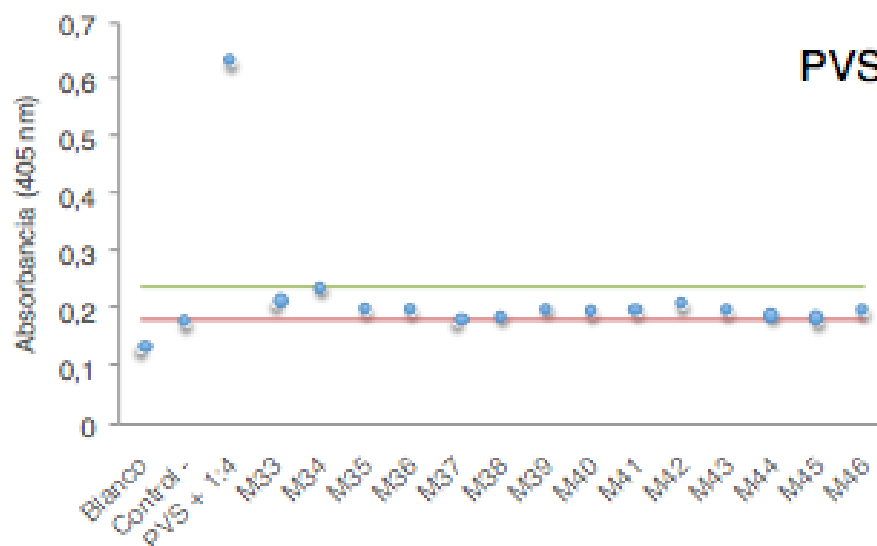
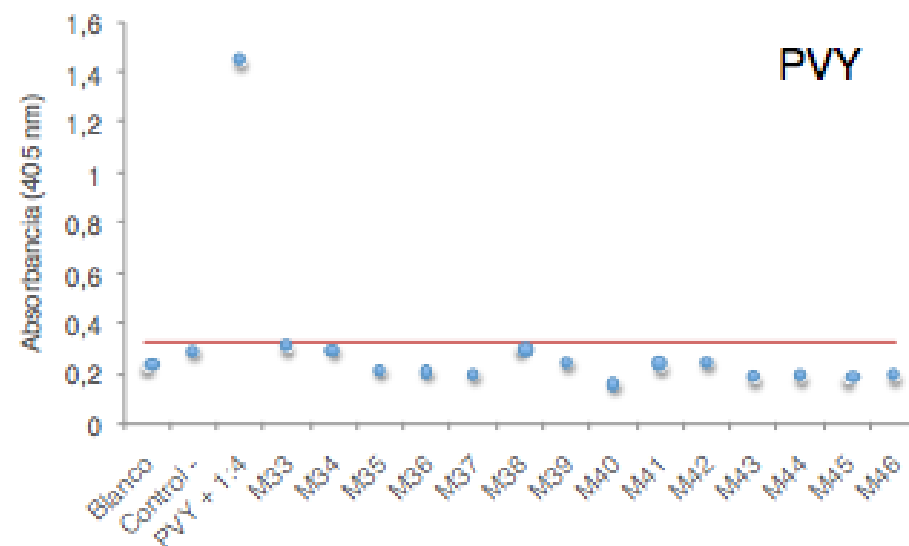
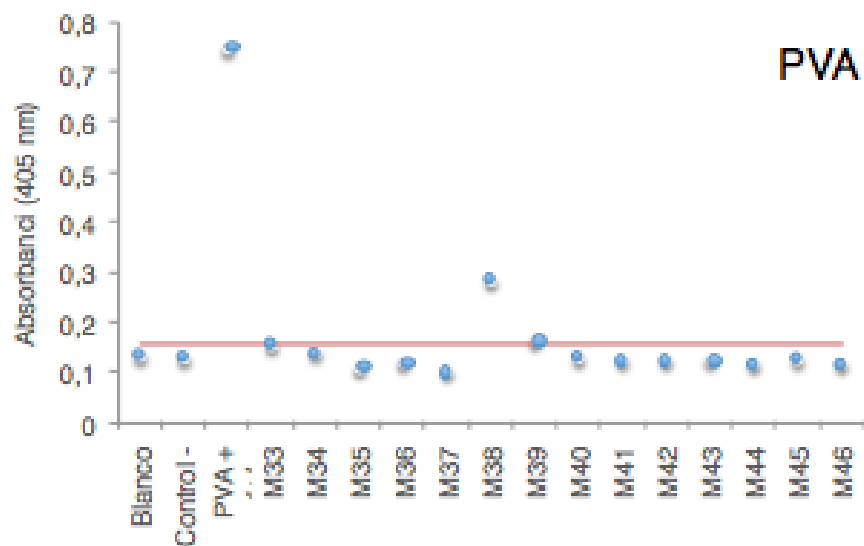
PVA	x=	0.12775	
	s=	0.0075	
control -	x+4s=	0.15775	← valor umbral

PVS	x=	0.1765	
	s=	0.001732	
control -	x+4s=	0.183428	← valor umbral (0.24)

PVY	x=	0.28825	
	s=	0.008958	
control -	x+4s=	0.324083	← valor umbral

PVX	x=	0.1045	
	s=	0.005568	
control -	x+4s=	0.126771	← valor umbral (0.137)

Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte III (33-46) (PVA, PVY, PVA y PVX)



- Valor umbral calculado  
 - Valor umbral ajustado

Pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero Parte IV (47-62) (PVA, PVY, PVS y PVX)  
Valores de Absorbancia 405 nm

	PVA			PVY			PVS			PVX		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.166	0.19	0.174	0.193	0.2	2.843	0.097	0.19	0.086	0.09	0.117	0.116
B	0.163	0.136	0.161	0.18	0.191	2.629	0.098	0.168	0.186	0.1	0.111	0.113
C	0.201	0.158	0.158	0.205	0.2	2.574	0.195	0.184	0.185	0.12	0.115	0.111
D	0.208	0.16	0.138	0.205	0.176	0.185	0.187	0.178	0.184	0.113	0.105	0.101
E	0.187	0.155	0.144	0.19	0.194	0.2	0.182	0.174	0.189	0.099	0.103	0.108
F	0.177	0.142	0.169	0.186	0.177	0.187	0.187	0.168	0.182	0.096	0.099	0.11
G	0.796	0.161	0.122	1.195	0.201	0.187	0.382	0.192	0.17	0.794	0.113	0.12
H	0.843	0.168	0.144	1.054	0.233	0.18	0.393	0.183	0.168	0.833	0.101	0.109

Disposición de los pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco GBE	M47	M55	Blanco GBE	M47	M55	Blanco GBE	M47	M55	Blanco GBE	M47	M55
B	Blanco GBE	M48	M56	Blanco GBE	M48	M56	Blanco GBE	M48	M56	Blanco GBE	M48	M56
C	Control -	M49	M57	Control -	M49	M57	Control -	M49	M57	Control -	M49	M57
D	Control -	M50	M58	Control -	M50	M58	Control -	M50	M58	Control -	M50	M58
E	Control -	M51	M59	Control -	M51	M59	Control -	M51	M59	Control -	M51	M59
F	Control -	M52	M60	Control -	M52	M60	Control -	M52	M60	Control -	M52	M60
G	PVA + 1:4	M53	M61	PVY + 1:4	M53	M61	PVS + 1:4	M53	M61	PVX + 1:4	M53	M61
H	PVA + 1:4	M54	M62	PVY + 1:4	M54	M62	PVS + 1:4	M54	M62	PVX + 1:4	M54	M62

valores en rojo= valores por arriba del valor umbral

PVA	x=	0.19325	
	s=	0.013913	
control -	x+4s=	0.248904	← valor umbral

PVS	x=	0.18775	
	s=	0.005377	
control -	x+4s=	0.20926	← valor umbral

PVY	x=	0.1965	
	s=	0.00995	
control -	x+4s=	0.236299	← valor umbral

PVX	x=	0.107	
	s=	0.011402	
control -	x+4s=	0.152607	← valor umbral



Gráficas de distribución de Absorbancia (405 nm) de las pruebas de ELISA realizadas a la población de plantas de invernadero. Parte IV (47-62) (PVA, PVY, PVS y PVX)

